

ANGELA OKAZAKI



**ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS E COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM SEMENTES DE *Passiflora edulis* f.  
*flavicarpa* Deneger (MARACUJÁ)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

1999

ANGELA OKAZAKI

**ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS E COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM SEMENTES DE *Passiflora edulis* f.  
*flavicarpa* Deneger (MARACUJÁ)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA  
1999

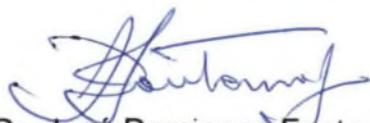
ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS E COMPOSTOS FENÓLICOS EM  
SEMENTES DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (MARACUJÁ)

por

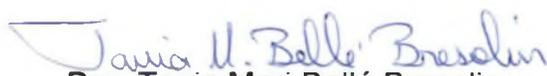
Angela Okazaki

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter (Orientadora)  
Depto. de Bioquímica – UFPR



Dr. José Domingos Fontana  
Depto. de Bioquímica – UFPR



Dra. Tania Mari Bellé Bresolin  
Depto. de Farmácia – UFPR

Curitiba, 30 de agosto de 1999

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter

Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos,  
se eu não tivesse o amor, seria como sino ruidoso (...).  
Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento  
de todos os mistérios e de toda a ciência;  
Ainda que eu tivesse toda a fé,  
a ponto de transportar montanhas,  
Se não tivesse o amor,  
Eu não seria nada.

1Cor 13, 1-2

***À Tia Cema:***

Meu exemplo de vida, fé e amor à família.  
A senhora é tudo para mim.

***Aos meus tios, tias, primos e primas:***

Nossa união é o que me faz seguir  
sempre em frente e lembrar que a alegria  
e o amor que nos une, vem dos  
ensinamentos da D. Maria e do Seu  
Emílio Zanatta.

À você Christiano, com todo o meu amor.

## Agradecimentos

A Deus que possui a verdadeira Sabedoria.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Joana Léa Meira Silveira Ganter, pela oportunidade, confiança, paciência, entusiasmo e amizade para a realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

À Prof<sup>a</sup>. Fany Reicher, por sua preocupação, colaboração, amizade e incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, coordenadora do Curso de Pós – Graduação, pelo seu incentivo, confiança, preocupação e atenção.

Ao Prof. Armando C. Cervi, do Departamento de Botânica pela identificação da espécie em estudo.

Ao Prof. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica, por ser sempre tão atencioso, prestativo e minucioso nas análises das colorações das sementes.

Ao Prof. José Domingos Fontana por sua atenção todos os dias, inclusive aos sábados, para as análises por TLC.

Ao Prof. Luis Pereira Ramos, pelas importantes dicas do HPLC.

À Ana Paula, sempre preocupada com os sustos que eu levava...Ana não era por sua causa, não se preocupe!

À Eliana, sempre atenciosa nos cálculos de diluição, concentração, ppm...

À Fabíola, minha cara metade de bancada, um amor de pessoa, sempre muito amiga.

À Gisele, (oi, trem!) preocupadíssima e ocupadíssima sempre.

Ao Juan, leia-se RRRuan, por favor!

À Luciane, sempre tudo organizadinho, que capricho!

Ao Renato, a bancada mais organizada do laboratório! Graurrr pra você!

À Silvia, festas sempre! Quer coisa melhor?

Às amigas que já passaram pelo laboratório Carmen, Eloisa, Tania Mari e Vanessa, agradeço pelo carinho.

À Tania Mara, ex-companheira de marmitta, sempre muito sincera e amiga.

À Daniele, minha calma, tranqüila e engraçada amiga, companheira de muitas coisas nestes dois anos e meio.

À Gládis e Guilhermina, agradeço muito pela amizade, apoio, solidariedade e carinho.

Ao César, pela amizade e análise por ESI-MS, muito importante neste trabalho.

Ao Adriano, Eduardo, Fábio, Guilherme, Jean, Júlio, Rodrigo, Sabrina e Sandra, pelos risos, festas e outros bons momentos que passamos juntos!

À Janice, pela atenção e auxílio na preparação da referata.

Ao Maurício Passos, pelas fotos das placas de TLC.

À Rosane, pela ajuda na preparação das amostras para análises por ESI-MS.

À D. Marilza pela solidariedade e auxílio prestado, sempre.

Às Bibliotecárias Isabella E. Fernandes, Ruth L. dos Santos e Mariza Kampfert e demais funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelos ensinamentos na arte bibliográfica e pela disposição em auxiliar nas dúvidas.

Ao Nilson B. Filho e Márcia Bündchen pela grande ajuda nas montagem das lâminas permanentes das sementes do maracujá.

À Vera R. F. Pionteke e Daura R. E. Stofella pelos serviços prestados no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

À Prof<sup>a</sup>. Ângela Badaró e Waleska do Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Farmácia desta instituição, pela confecção das placas de PTLC.

À Ivone Zonta e Sr. Sebastião que muitas vezes com um simples sorriso, faziam o dia ser bem melhor.

À Berenice, sempre incentivando-me a seguir em frente.

À Carmenlúcia, amiga tão sincera, prática e realista.

Ao Dalton, sempre atencioso, amigo, conselheiro e um bom ombro pra chorar mas, pra rir também!

À Lires, minha "irmã mais velha", deste tipo de amizade a gente nunca esquece.

À Maité, minha amiga-irmã de sempre! De aulas de farmacologia, de madrugadas de provas de genética, de muito sorvete, de cinema, de choro, de comemorações, de internet, de música sertaneja,...é só alegria!!!! Alguri!!!!!!

Ao Dr. Nélio, sempre amigo, carinhoso e atencioso mesmo me enchendo de agulhas!

À Roberta e Elisangela, sorrir é o que interessa o resto a gente tira de letra!

Ao Zezinho (*in memoriam*), eu consegui! Um dia a gente se encontra, novamente.

À Universidade Federal do Paraná, por ter viabilizado a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A Curitiba, cidade de muitos sonhos realizados...

## Sumário

<b>Lista de tabelas</b> .....	XI
<b>Lista de figuras e esquemas</b> .....	XII
<b>Lista de siglas</b> .....	XV
<b>Resumo</b> .....	XVI
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Maracujá.....	4
1.1.1. Classificação botânica (CRONQUIST, 1988).....	5
1.1.2. Descrição morfológica das sementes.....	5
1.1.3. Distribuição geográfica.....	5
1.1.4. Aplicações na indústria e agropecuária .....	6
1.2. Polissacarídeos .....	8
1.2.1. Hemiceluloses.....	10
1.3. Compostos Fenólicos.....	12
<b>Objetivos</b>	
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
<b>Materiais e Métodos</b>	
3.1. Materiais e Métodos Gerais.....	20
3.2. Métodos Cromatográficos.....	22

3.2.1. Cromatografia de partição em papel (CP) e em camada delgada (TLC).....	22
3.2.2. Cromatografia líquido gasosa (GLC).....	23
3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	23
3.3. Espectrometria de Massa – ESI-MS ( Espectrometria de massa de ionização por “eletron spray”), acoplado a Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC).....	23
3.4. Obtenção das Sementes de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deneger.....	24
3.5. Obtenção dos Polissacarídeos das Semente.....	24
3.5.1. Extração com tolueno : etanol.....	25
3.5.2. Extrações Aquosas.....	25
3.5.3. Extrações Alcalinas.....	26
3.6. Hidrólise Ácida.....	26
3.7. Redução e Acetilação dos Produtos Obtidos nas Hidrólises ácidas.....	26
3.8. Microscopia Fotônica.....	27
3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	28
3.10. Extração dos Compostos Fenólicos.....	28

**Resultados e Discussão**

4.1. Obtenção dos Polissacarídeos.....	30
4.2. Análise Microscópica das Sementes de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....	37
4.3. Análise dos Compostos Fenólicos.....	42
<b>5.Conclusões</b> .....	<b>57</b>
<b>6.Referências Bibliográficas</b> .....	<b>61</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais classes de compostos fenólicos presentes nas plantas .....	13
<b>Tabela 2.</b> Rendimentos em massa das frações obtidas por extrações das sementes totais e amêndoas de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....	33
<b>Tabela 3.</b> Determinação das dosagens de açúcar total, ácido urônico e proteína das frações hemicelulósicas (álcali 2N), obtidas das sementes totais e amêndoas de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....	34
<b>Tabela 4.</b> Composição monossacarídica das frações obtidas a partir das extrações das sementes totais e amêndoas de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (maracujá).....	36
<b>Tabela 5.</b> Análise comparativa das diferentes extrações dos fenólicos totais das sementes totais de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....	44

## Lista de figuras e esquemas

- Figura 1.** Folhas e fruto com e sem exposição da polpa com sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá)..... 7
- Figura 2.** Modelo simplificado da estrutura da parede celular mostrando as interações das três classes de polissacarídeos (MCCANN *et al.* 1990)..... 9
- Figura 3.** Estruturas de alguns compostos fenólicos presentes nas plantas (fonte modificada de STRACK, 1997) ..... 14
- Figura 4.** Frutos, flores e folhas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá)..... 30
- Figura 5. A)**Vista geral da superfície da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (microscopia eletrônica de varredura = MEV); **B)**Detalhe do poro da figura..... 38
- Figura 6. A)**Vista geral por microscopia fotônica (MF) da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal, utilizando coloração de azul de toluidina; **B)** Detalhe da região central mediana em secção transversal (MF)..... 39
- Figura 7.** Tegumento da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF), evidenciando lignina em amarelo-esverdeado e compostos fenólicos em verde..... 40
- Figura 8.** Componentes da amêndoa de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF)..... 40

- Figura 9.** **A)** Detalhe do endosperma de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF); **B)** Detalhe dos cotilédones em secção transversal (MF)..... 41
- Figura 10.** Cromatografia em camada delgada das extrações de compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, vizualizada por UV..... 46
- Figura 11.** Cromatografia em camada delgada das extrações de compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, revelada com *p*- anisaldeído..... 47
- Figura 12.** Perfis cromatográficos por HPLC, utilizando como solvente acetoneitrila:água (65:35 v/v) e comprimento de onda de 240nm, a partir dos extratos purificados de semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* por PTLC: **A)** fração FV; **B)** fração FA; **C)** fração FAC; **D)** fração FL e **E)** fração FR..... 49
- Figura 13.** Espectros dos extratos de semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, purificados por PTLC, obtidos a partir dos íons moleculares detectados pelo ESI-MS: **A)** fração FV; **B)** fração FA; **C)** fração FAC; **D)** fração FL e **E)** fração FR..... 51
- Figura 14.** Cromatograma de HPLC do ácido salicílico, obtido por detecção de: **A)** UV **B)** ESI-MS..... 53
- Figura 15.** Espectro de massa – ESI-MS do padrão de ácido salicílico (modo negativo)..... 53
- Figura 16.** Cromatograma de HPLC do ácido ferúlico, obtido por detecção de: **A)** UV **B)** ESI-MS..... 54

<b>Figura 17.</b> Espectro de massa – ESI-MS do padrão de ácido ferúlico (modo negativo).....	54
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas do ácido salicílico e ácido gálico, obtidos a partir dos íons detectados na fração FV por ESI-MS: <b>A)</b> íon molecular 137, referente ao ácido salicílico e <b>B)</b> íon molecular 169, referente ao padrão interno (ácido gálico).....	55
<b>Esquema 1.</b> Processo de extração dos polissacarídeos de sementes totais e amêndoa de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deneger.....	32
<b>Esquema 2.</b> Processos de extração de compostos fenólicos a partir das sementes totais de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deneger (maracujá).....	43

## Lista de siglas

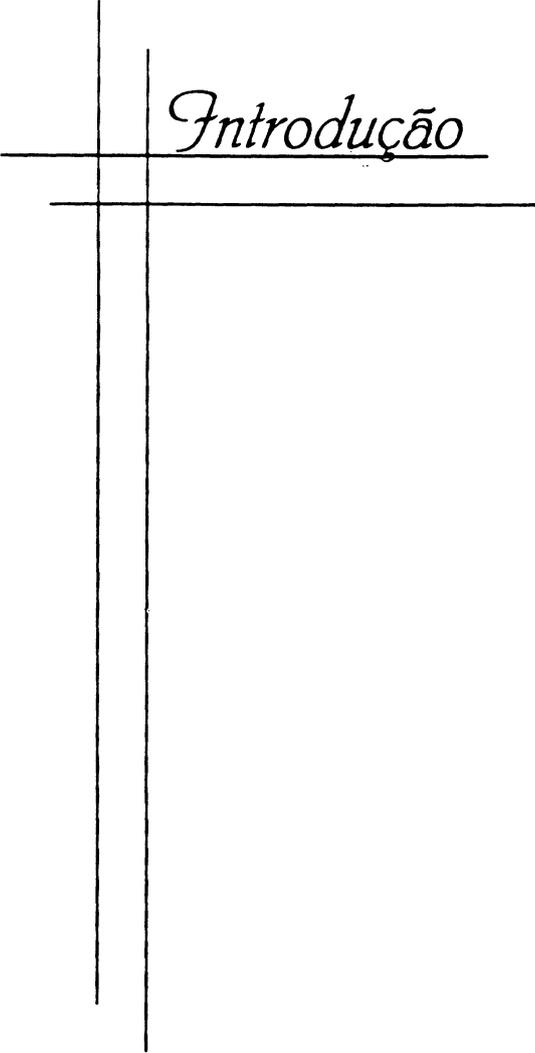
BSA.....	soroalbumina bovina
CP.....	cromatografia em papel
ESI-MS.....	espectrometria de massa de ionização por "eletron spray"
GLC.....	cromatografia líquida gasosa
HPLC.....	cromatografia líquida de alta eficiência
MEV.....	microscopia eletrônica de varredura
MF.....	microscopia fotônica
PTLC.....	cromatografia em camada delgada preparativa
TLC.....	cromatografia em camada delgada
$\lambda$ .....	comprimento de onda
m/z.....	relação massa-carga
m/v.....	relação massa por volume
m/m.....	relação massa-massa
UV.....	ultra violeta
v/v.....	relação volume por volume

## Resumo

O maracujá, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (Passifloraceae), é um fruto muito cultivado dada a qualidade do seu suco. Entretanto, seus subprodutos, como as sementes, não tem recebido a mesma atenção. As sementes foram moídas e deslipidificadas em extrator Soxhlet com tolueno:etanol (2:1 v/v). O resíduo da extração em Soxlet e as sementes isentas de tegumento (amêndoa), previamente inativadas em água fervente, foram submetidas a extração aquosa sequencial a 25°C e 80°C, e alcalinas (NaOH) 2N e 4N. As extrações alcalinas 2N foram aquelas de maior rendimento, as quais foram analisadas por GLC, como alditóis acetatos. A composição monossacarídica das sementes totais (HA<sup>s</sup>- ca 4,58g%) e amêndoas (HA<sup>a</sup>-ca 1,46g%) foram: HA<sup>s</sup>-arabinose (20,37%), xilose (14,84%), manose (10,22%), galactose (16,75%), glucose (18,69%) e fucose (19,13%), e HA<sup>a</sup>-arabinose (13,24%), xilose (14,13%), manose (42,39%), galactose (11,59%), glucose (18,65%). Estas frações apresentaram elevados teores de proteína (HA<sup>s</sup>=70% e HA<sup>a</sup>= 57%) e baixos teores em açúcares (HA<sup>s</sup>=3,9% e HA<sup>a</sup>= 2,6%). A partir da análise por microscopia fotônica, foi observado que o tegumento das sementes de *P. edulis* era esclerificado, constituído por células alongadas, de paredes espessadas, lignificadas e pode-se evidenciar a presença de compostos fenólicos. As sementes de maracujá foram então submetidas a diferentes extrações (metanol, acetato de etila, hexano e HCl 1% em metanol) para a obtenção dos compostos fenólicos. A extração destes compostos com metanol foi a mais eficiente (55,6 % m/m). O extrato metanólico, após tratamento pelo método de FOLCH, foi analisado por GLC e comprovou-se a presença de 31% de açúcares e 69% de glicerol (provavelmente, proveniente da fração lipídica). Dentre os açúcares estão: ramnose(1,71%); xilose (4,23%); manose (2,33%); galactose (1,76%) e glucose (21,0%). O extrato foi purificado por PTLC obtendo-se 5 frações em ordem ascendente: FV; FA; FAC; FL e FR. A partir da técnica de espectrometria de massa de ionização por "eletron spray" (ESI-MS), acoplado ao HPLC foi possível a identificação do ácido salicílico e ferúlico nos extratos purificados por PTLC. Para a quantificação destes compostos utilizou-se como padrão interno o ácido gálico obtendo-se os seguintes resultados em ácido salicílico: FV 0,04% (m/m); FA 0,07% (m/m); FAC 0,015% (m/m); FL 0,004% (m/m) e FR 0,13% (m/m). A presença de traços de ácido ferúlico foi evidenciada nas frações FA; FAC e FL.

HA<sup>s</sup> – hemicelulose A de sementes totais

HA<sup>a</sup> – hemicelulose A de amêndoas



*Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

As sementes são resultantes de profundas modificações processadas no rudimento seminal, após a ocorrência da fecundação (CUTTER, 1986). Com o início da nova semente, ocorre então, o seu desenvolvimento e quando maduras, são o meio de dispersão da espécie. Assim, a semente ocupa uma importante posição na história da vida de uma planta superior. O sucesso com o qual o novo indivíduo é estabelecido no tempo e lugar e o vigor da planta jovem é, em grande parte, determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas das sementes (BEWLEY & BLACK, 1986).

Uma característica marcante das sementes é a propriedade de permanecerem em estado de dormência com um mínimo de atividade metabólica, podendo crescer e desenvolver-se de acordo com as condições ambientais (BEWLEY & BLACK, 1978). As plantas com sementes possuem uma maior vantagem seletiva sobre os grupos ancestrais portadores de esporos (RAVEN *et al.*, 1996).

Segundo LABOURIAU (1983) na América Latina existe uma vasta fonte de problemas sobre a germinação de sementes. Um exemplo, seria que algumas sementes possuem uma casca que pode afetar a dormência e oferecer resistência mecânica ao crescimento da radícula. Acredita-se também que, esta camada externa da semente, pode constituir uma barreira física que impede o acesso do oxigênio ao embrião (CARVALHO, 1994).

A casca pode ser constituída apenas pelo tegumento ou também pelo pericarpo. O tegumento é formado por camadas celulares originadas nos tegumentos

do óvulo, enquanto o pericarpo é originado da parede do ovário (BEWLEY & BLACK, 1978).

As sementes são constituídas por um tegumento externo que envolve a amêndoa. A amêndoa, é composta pelo embrião e endosperma ou albumem. O embrião das sementes pode possuir um ou dois cotilédones e apresentar ou não endosperma (AGAREZ, 1994).

O tegumento, que constitui o envoltório da semente, é responsável pela primeira defesa das mesmas contra as condições ambientais adversas. Sua dureza é a responsável pela proteção mecânica, invasão de microorganismos e oscilações de temperatura e umidade sofridos pelas sementes durante o armazenamento (MOHAMEDY *et al.*, 1994).

O embrião é formado por um tecido meristemático que em condições propícias para a germinação cresce e origina a planta. Em muitas plantas, as reservas alimentares não estão no próprio embrião, mas particularmente nos tecidos adjacentes, como o endosperma (FOSKET, 1994).

O endosperma, encontrado em quantidade variável nas sementes, é o resultado da fusão dos núcleos polares com um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen (CARVALHO & NAKAGAWA, 1980). Possui função de reserva durante a germinação e para a nutrição do embrião. Age também como um tecido de absorção de água para a semente, prevenindo contra a sua perda no período de seca, o que poderia causar a desnaturação das proteínas em particular das enzimas essenciais à germinação (REID, 1985).

Em plantas dicotiledôneas, os cotilédones são os órgãos de armazenagem de proteínas, óleos e amido (FOSKET, 1994).

A estrutura da semente é considerada de grande importância na taxonomia. Por meio de várias características, muitas sementes de importância econômica, podem ser identificadas até o nível de espécies (CORRÊA, 1984).

Sementes maduras contêm substâncias de reserva em quantidades apreciáveis que são geralmente sintetizadas, concomitantemente, durante o seu processo de desenvolvimento (BEWLEY & BLACK, 1986). Considerando-se os constituintes metabólicos, o tecido de reserva é constituído principalmente por três substâncias: carboidratos, lipídeos e proteínas. A quantidade com que cada uma destas substâncias entra na composição da semente é variável, dependendo principalmente da espécie. Normalmente, uma destas três substâncias predomina sobre as outras, resultando em sementes amiláceas, oleaginosas ou protéicas (CARVALHO & NAKAGAWA, 1980).

Os metabólitos secundários são muito importantes na evolução das angiospermas. Estes produtos não são mais considerados resíduos metabólicos e incluem uma gama de compostos químicos, como alcalóides, óleos essenciais, glicosídeos, flavonóides e até mesmo ráfides (cristais aciculares de oxalato de cálcio). A presença de alguns destes compostos, pode caracterizar famílias inteiras ou grupos de famílias de angiospermas. Na natureza, estas substâncias parecem ter um papel importante, seja restringindo a palatabilidade das plantas nas quais ocorrem, ou fazendo com que animais evitem estas plantas (RAVEN *et al.*, 1996).

O Brasil desconhece muitas fontes importantes de matéria prima encontrada na forma de subprodutos industriais, as quais teriam aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e química em geral. Um exemplo são as sementes de maracujá, um subproduto da indústria de suco que representa um rejeito de toneladas ao ano. A FRUTEZA SUCOS NATURAIS LTDA , considerada uma indústria de médio porte da região oeste de São Paulo, trabalha com o suco de maracujá onde são processadas em média 2000 toneladas de frutos ao ano, gerando um rejeito de 12 toneladas de sementes ao ano.

### **1.1. Maracujá**

Esta fruta é conhecida popularmente por vários nomes: maracujá-de-comer, (Santa Catarina); maracujá-redondo, maracujá-mirim, maracujazinho (Rio de Janeiro); maracujá-peroba (Pará e Paraíba); maracujá-roxo, maracujá-preto (São Paulo e Rio Grande do Sul) ou simplesmente, maracujá (Paraná, Santa Catarina e São Paulo) (CERVI, 1997).

### **1.1.1. Classificação botânica (CRONQUIST, 1988)**

Nome: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger

Sinônimo: Maracujá

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Dillenidae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae

### **1.1.2. Descrição morfológica das sementes**

As sementes são ovais, de 5-6 mm de comprimento por 3–4 mm de largura, dureza elevada, cor creme, foveoladas (CERVI, 1997).

As sementes são providas de arilo, que é uma excrecência carnosa que se desenvolve na base do óvulo e envolve a semente (ESAU, 1989).

### **1.1.3. Distribuição geográfica**

É nativa do Brasil, encontrada nos estados de Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Brasília, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Também pode ser encontrada na Argentina, Paraguai, Colômbia, Perú, Equador, Venezuela, Jamaica, Guatemala, Costa Rica, Bermudas, Cuba, Porto Rico, Martinica, Trindade. Sendo amplamente cultivada na Austrália e Hawai (CERVI, 1997).

#### 1.1.4. Aplicações na indústria e agropecuária

A *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger é, provavelmente, a mais cultivada entre as espécies de *Passiflora*, por seu valor econômico na indústria de sucos, sendo que aproximadamente 1/3 do peso da fruta é constituído por suco.

A planta floresce e frutifica praticamente o ano todo (CERVI, 1997).

As características gerais das flores do maracujá conferem ao fruto um outro nome mais difundido no exterior: fruto-da-paixão ou "passion fruit". Estas podem ser utilizadas na decoração sob a forma de caramanchões e cercas vivas.

Do arilo da semente (figura 1) extrai-se o principal produto da fruta: o suco, que pode ser utilizado na fabricação de refrescos, sorvetes, gelatinas, xaropes, geléias, mousses, vinho, licor, etc. O suco de maracujá é constituído por açúcares, celulose, vitamina B1 e C, além de pequenas quantidades de proteínas e gorduras o que confere-lhe 70 calorias por 100 gramas de suco (TOCCHINI *et al.*, 1994).

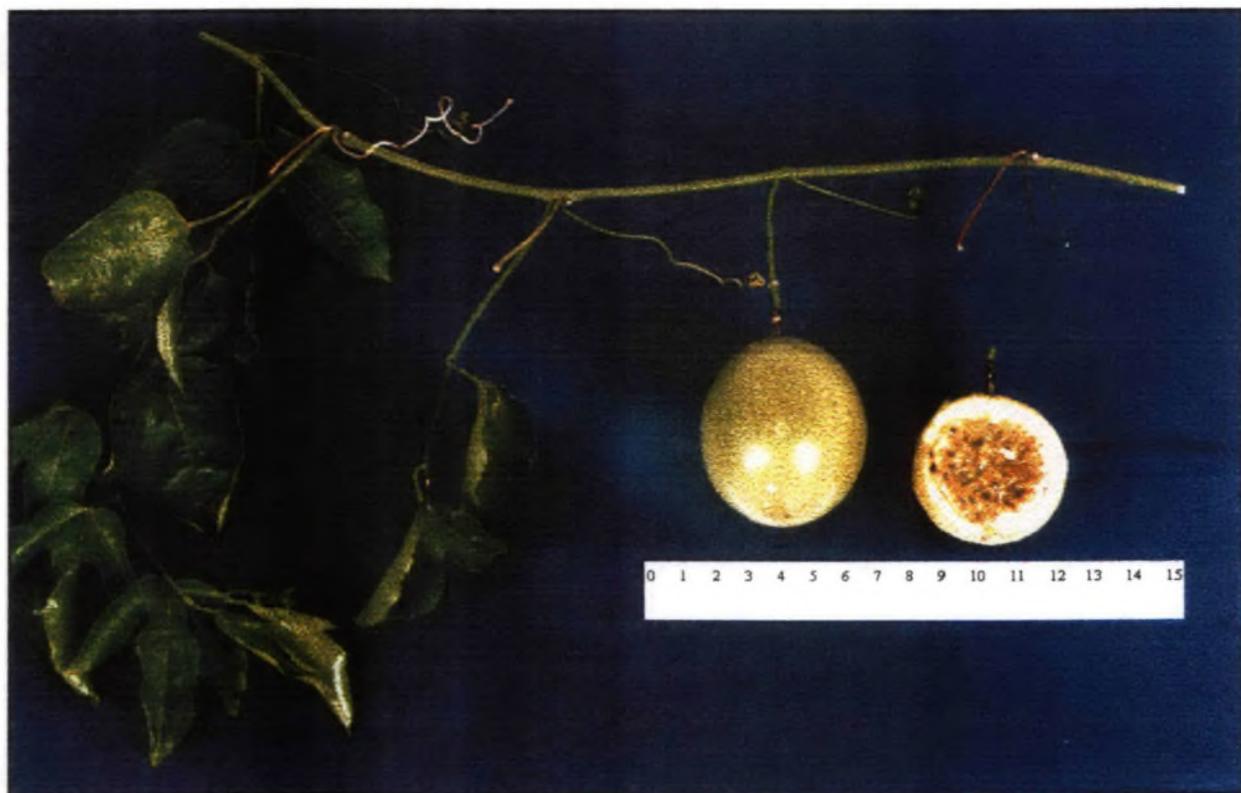
Tanto as folhas quanto as raízes possuem o princípio ativo passiflorina. A passiflorina é similar à morfina, sendo assim, um medicamento aplicado como sedativo e que, apesar de narcótico, não deprime o sistema nervoso atuando com segurança e rapidez (CARVALHO, 1970).

Como conseqüência da industrialização do suco de maracujá, cascas e sementes do fruto são acumulados como subprodutos em aproximadamente 50 e 13%, respectivamente (TOCCHINI *et al.*, 1994).

A casca do fruto pode ser utilizada na fabricação de geléias e gelatinas, na preparação da ração do gado de corte e leiteiro, ou ainda, empregada como adubo

orgânico. É rica em aminoácidos, proteínas, carboidratos e contém de 10 a 20% de pectina, sendo esta, de qualidade semelhante a da laranja (CARVALHO, 1968). Segundo ROCHA & SILVA (1981), a pectina da casca do maracujá possui 7,9% de grupos metoxílicos estereificados e 80,2% de ácido galacturônico

Segundo CORRÊA *et al.* (1994) as sementes possuem em média 10% de proteínas e 27% de óleo que pode ser utilizado na indústria cosmética ou na alimentação humana que segundo Manica (1981) é considerado melhor que o óleo de algodão em relação ao valor alimentar e digestibilidade.



**Figura 1.** Folhas e fruto com e sem exposição da polpa com sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá).

Visando então, um maior aproveitamento das sementes de maracujá, consideradas subprodutos na indústria de extração de suco, foi realizada uma investigação da composição polissacarídica e de compostos fenólicos das sementes do mesmo.

## **1.2. Polissacarídeos**

Os polissacarídeos constituem a maior fonte de matéria orgânica renovável da natureza, dos quais, celulose e hemiceluloses constituem os principais componentes de todas as plantas terrestres superiores (FENGEL & WEGENER, 1989). O segundo composto mais abundante entre os polímeros naturais é a lignina que incrusta paredes de muitos tipos de células, conferindo-lhes rigidez (SARKANEN & LUDWIG, 1971). A parede celular é composta basicamente por complexos ligno-celulósicos, constituídos por celulose, hemiceluloses e lignina (ESAU, 1976).

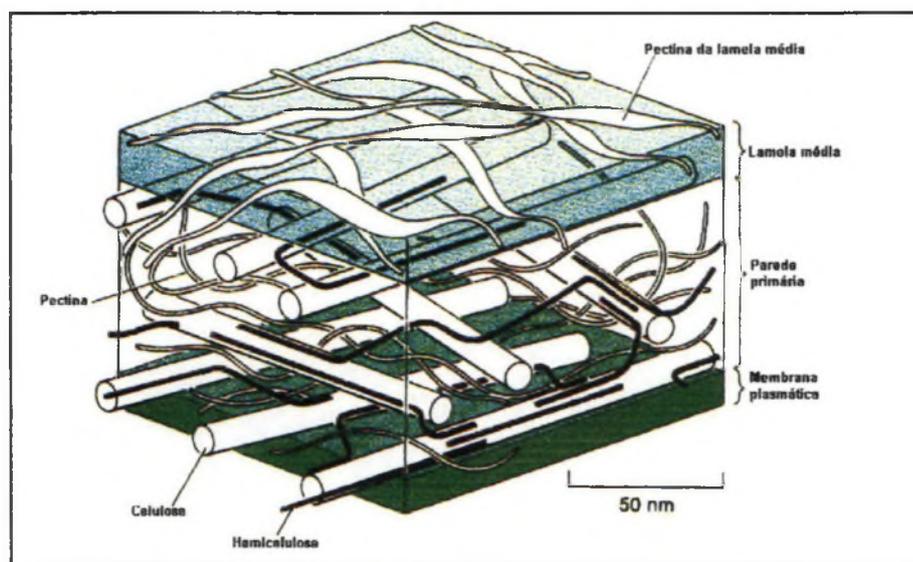
A parede celular possui várias funções como, dar sustentação e forma para a célula e rigidez para a planta como um todo; controlar o crescimento celular por enfraquecimento seletivo da parede; proteger a planta do ataque de patógenos e predadores; participar da comunicação célula-célula. É provável que esta multiplicidade de funções seja a causa da complexidade de sua estrutura (BRETT & WALDRON, 1990).

A figura 2 é uma representação esquemática de como os polímeros podem estar dispostos espacialmente na parede celular primária. Neste modelo, os tamanhos e os espaços dos polímeros são baseados nas medidas das células nativas (FOSKET, 1994).

Além da parede primária existe uma outra parede mais interna, a parede secundária, que é mais espessa conferindo a rigidez aos tecidos; sendo menos ativa metabolicamente e representando depósito de polifenólicos de lignina.

A lamela média é uma fina camada que une as células vegetais e é responsável pela integridade estrutural dos tecidos da planta. É composta principalmente por lignina (FENGEL & WEGENER, 1989).

Mais recentemente, CARPITA & GIBEAUT (1993) elaboraram modelos para dois tipos de paredes celulares primárias de Magnoliopsida. O modelo de parede celular chamado tipo I, engloba paredes de dicotiledôneas em geral e algumas paredes de monocotiledôneas. O segundo modelo, parede celular do tipo II, inclui as paredes da maior parte das famílias de monocotiledôneas.



**Figura 2.** Modelo simplificado da estrutura da parede celular mostrando as interações das três classes de polissacarídeos (MCCANN *et al.* 1990)

As paredes do tipo I são compostas por uma rede de fibras de celulose, formadas por microfibras de 5-15 nm de largura e espaçadas de 20-40 nm, enoveladas como uma bobina. As fibras de celulose são entrelaçadas, basicamente pelas cadeias de xiloglucanas. Esta rede formada entre xiloglucana – celulose é considerada o principal sistema de controle da expansão celular. Nas paredes espessas do endosperma e cotilédones de algumas sementes podem ser encontrados polissacarídeos hemicelulósicos como gluco- e galactoglucomanas, galactomananas, (1→3)  $\beta$ -D-glucanas e glucuronoarabinoxilanas (CARPITA & GIBEAUT, 1993; ZABLACKIS *et al.*, 1995).

A parede celular primária tipo II, é composta pelas microfibrilas de celulose, porém estas estão interligadas por cadeias de glucuronoarabinoxilanas (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

Estes modelos são bastante representativos mas não abrangem as variações que ocorrem nas paredes, visto que as plantas estão classificadas em vários grupos taxonômicos diferentes, ou seja, as paredes celulares também diferem grandemente na aparência.

### **1.2.1. Hemiceluloses**

O termo hemicelulose designa polissacarídeos de baixa massa molecular que ocorrem em tecidos de plantas, em geral associados à celulose. Podem ser isolados do material original ou deslignificado, por extração alcalina (ASPINALL, 1959; WHISTLER, 1953).

A composição e proporção de polissacarídeos, celulose, lignina e hemiceluloses dentro de um mesmo vegetal é variável pois depende de fatores como, o estágio de desenvolvimento do mesmo assim como as várias partes morfológicas existentes.

Em plantas terrestres, as principais unidades constituintes das hemiceluloses são: D- xilose, D- manose, D- glucose, D- galactose, L- arabinose e ácido urônico. E em menor quantidade estão: L- ramnose, L- fucose, e outros açúcares neutros, em menor proporção (TIMELL, 1964).

As hemiceluloses podem assumir funções estruturais quando apresentam-se de forma fibrosa, compactada ou cristalina; ou outras funções biológicas quando na forma de um gel compactado nas paredes celulares em crescimento (MORRAL & BRIGGS, 1978). Muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas dependem de modificações na estrutura da parede celular (FOSKET, 1994).

Geralmente as hemiceluloses ligam-se a lignina. As ligninas são componentes característicos da parede celular secundária e constituem um grupo de polímeros fenilpropanóides heterogêneos nas plantas, onde formam um importante constituinte da parede celular dos tecidos de suporte e condução (células de xilema). Esses tecidos capacitam as plantas vasculares a desenvolverem-se como estruturas sustentáveis na posição vertical, como as árvores. A lignina está sempre associada com polissacarídeos de parede (celulose e hemicelulose) (STRACK, 1997).

### 1.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos continuam despertando a atenção dos pesquisadores devido a sua extensa presença na natureza e às diversas funções que desempenham nas plantas.

Os compostos fenólicos, referem-se a um grupo de substâncias denominadas de metabólitos secundários, que possuem em comum um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, e que ocorrem freqüentemente como glicosídeos (combinados com unidades de açúcares). Dentre os compostos fenólicos podemos citar os flavonóides que entre os milhares de compostos de ocorrência natural, formam o maior grupo, além de cumarinas, xantonas entre outros. As ligninas, melaninas e taninos são polifenóis. Ocasionalmente, unidades de fenóis são também encontradas em proteínas, alcalóides e na constituição dos terpenóides. (HARBORNE, 1984).

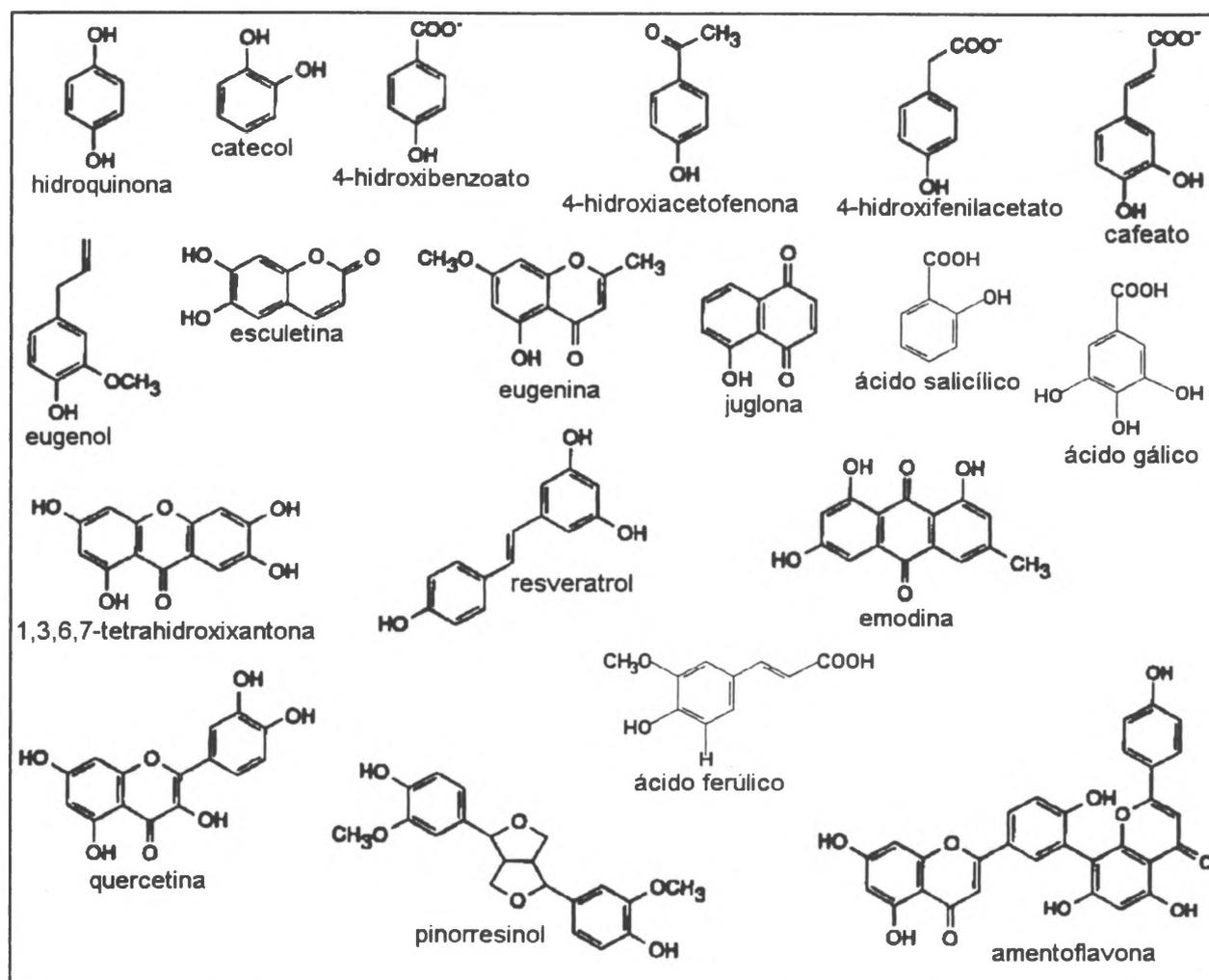
Nas plantas, a presença desses compostos aparentemente não possui uma função direta no crescimento e desenvolvimento das mesmas. Ao contrário dos metabólitos primários, como a clorofila, aminoácidos, nucleotídeos e carboidratos que exercem função direta sobre os processos de assimilação, respiração e transporte, os metabólitos secundários possuem uma distribuição mais restrita, isto é, são tipicamente encontrados em algumas espécies de plantas ou grupos taxonomicamente relacionados (TAIZ & ZEIGER, 1991). As principais classes de compostos fenólicos estão listadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Principais classes de compostos fenólicos presentes nas plantas

Número de carbonos	Cadeia carbônica	Classe dos Compostos	Exemplo de compostos	Exemplos de ocorrência
6	C <sub>6</sub>	Fenólicos simples	Hidroquinona	arbutina em Rosaceae e Ericaceae.
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Hidroxi-benzoatos	Catecol 4-hidroxibenzoato	urushiol em radicais toxodendrol principalmente nas paredes celulares na maioria das famílias
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas Fenilacetatos	4-hidroxi-acetofenona 4-hidroxi-fenilacetato	piceina em <i>Picea abies</i> em <i>Taraxacum officinale</i>
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroxicinamatos Fenilpropenos	Cafeato Eugenol	clorogenato em Solanaceae nos óleos essenciais de várias famílias
		Cumarinas	Esculetina	cicorina em <i>Eugenia aromatica</i>
		Cromonas	2-metil-5-hidroxi-7-metoxicromone	eugenina em <i>Eugenia aromatica</i>
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona	como 5-O-glucosideo em Juglandaceae
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas	1,3,6,7-hidroxixantona	mangiferina em <i>Mangifera indica</i>
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol	em árvores de <i>Eucalyptus</i>
		Antraquinonas	Emodina	emodina 6-O-glucosideo em <i>Rheum palmatum</i>
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonóides	Quercetina	rutina em várias famílias
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanas	Pinoresinol	em <i>Picea</i> e <i>Pinus</i>
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonóides	Amentoflavona	na maioria das gymnospermas
<i>n</i>	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catecol melaninas	Polímero de naftaleno	no ascomiceto <i>Daldinia concentrica</i>
	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub> :Glc	Taninos hidrolizáveis	Galotaninos	tanino chinês em galha de <i>Rhus semialata</i>
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas	Guaiacil ligninas Guaiacil-siringil-ligninas	ligninas em gymnospermas ligninas em angiospermas
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados	Polímeros de catequina	tanino em casca de <i>Quercus robur</i>

(C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)<sub>n</sub>:Glc = poliéster com glucose (Glc) como o polioli central comum; arbutina = hidroquinona-O-β-glucosideo; urushiol = catecol com um hidrocarbono C<sub>15</sub> ao lado da cadeia [-(CH<sub>2</sub>)-CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>]; piceina= 4-glucosiloxiacetofenona; clorogenato= 5-O-cafeoilquinato; cicorina= esculetina 7-O-β-glucosideo; eugenina= 2-metil-5-hidroxi-7-metoxicromone; mangiferina= 1,3,6,7-tetrahidroxixantona 2-C-β-glucosideo; rutina= quercetina 3-O-rutinosideo (STRACK, 1997).

A figura 3, apresenta algumas das estruturas presentes na tabela 1.



**Figura 3.** Estruturas de alguns compostos fenólicos presentes nas plantas (fonte modificada de STRACK, 1997)

Os compostos fenólicos possuem inúmeras funções, entre elas a capacidade de constituir importantes mecanismos de resistência em certas interações planta-patógeno (TAIZ & ZEIGER, 1991). Como por exemplo, a inibição do crescimento de microorganismos no tegumento de sementes (MOHAMEDY *et al.*, 1994). São capazes de atrair polinizadores e animais frutos-dispersores; ou ainda, reduzir o

crescimento de plantas competidoras. LI *et al.* (1992) descreveram os ácidos p-cumárico, ferúlico, vanílico, p-hidroxibenzóico, e p-hidroxibenzaldeído como os compostos fenólicos voláteis das folhas de *Sasa cernua*, uma erva daninha, responsáveis pela inibição do desenvolvimento de alface, trigo, capim-de-rebanho e amaranto verde.

Esses mesmo compostos, ainda segundo LI *et al.* (1992) causaram a supressão da germinação dessas espécies de sementes em solo rizósporo de *Sasa cernua*. A inibição da germinação das sementes dessas espécies foi de 42-80% em comparação com o solo controle.

Os ácidos p-cumárico, ferúlico, vanílico, p-hidroxibenzóico, e p-hidroxibenzaldeído foram identificados por HPLC como os principais compostos aleloquímicos no solo de *Sasa cernua*. Os resultados confirmaram que esta erva daninha produz uma típica alelopatia através do solo e espaço aéreo.

Segundo LEVIMINZI *et al.* (1994) ácidos fenólicos como, orto e meta cumárico, ferúlico e orto hidroxibenzóico mostraram uma forte atividade inibitória sobre a germinação das sementes de trigo. O ácido p-hidroxibenzóico extraído por hidrólise ácida, do sarcotesta das sementes de papaia (*Carica papaya* L.), comprovou ser o maior inibidor da germinação destas sementes segundo CHOW & LIN (1991).

MACIEL *et al.* (1992) descreveram, que os compostos fenólicos, podem atuar como ativadores ou inibidores do sistema enzimático das plantas.

Os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes, sendo esta a mais estudada delas. ZUKALOVA & VASAK (1998) relataram o processo de

oxidação do óleo de colza (*Brassica napus* L.), causado por lipoxigenases. O óleo extraído das sementes apresentou antioxidantes naturais como tocoferol e compostos fenólicos, sendo o último um inibidor significativo da atividade da lipoxigenase. Os principais fenólicos presentes nestas sementes são o ácido sinápico e éster de colina de ácido sinápico-sinapina.

SHAHIDI (1992) também demonstrou que o ácido sinápico principalmente na sua forma esterificada, foi o principal ácido fenólico presente no óleo das sementes de colza, canola e mostarda.

A estabilidade oxidativa do óleo virgem de oliva está também relacionada com a composição de triacilgliceróis, compostos fenólicos polares e outros componentes segundo PSOMIADOU & TSIMIDOU (1998).

No processo de extração do óleo de girassol, as sementes são decorticadas. Estas cascas, consideradas subprodutos, foram estudadas a fim de promover um maior aproveitamento por BAZUS *et al.* (1992). Os autores propuseram um refinamento de modo a oferecer três amplas aplicações: primeiro, a extração de ceras e compostos fenólicos, os quais podem ser usados em cosméticos e como antioxidantes; segundo, a extração de hemiceluloses que podem ser utilizadas na indústria de espessantes e terceiro, as lignoceluloses residuais, para utilização nos processos de manufatura de isolantes térmicos de concretos.

Há também um interesse nas atividades farmacológicas e esclarecimento quanto ao destino e efeito dos compostos fenólicos no corpo humano pois estes produtos estão extensamente presentes em plantas alimentícias e bebidas populares.

Os flavonóides são compostos fitoquímicos que não podem ser sintetizados por humanos mas, estão amplamente distribuídos nos alimentos que utilizamos. PETERSON & DWYER (1998) citaram a ocorrência de flavanonas em frutas cítricas, flavonas nas ervas, isoflavonóides nos legumes, antocianidinas e catequinas nas frutas e flavonóis em várias frutas e vegetais. Seus estudos *in vitro* e em animais demonstraram que os flavonóides possuem atividade antioxidante e antimutagênica. Outros estudos sugeriram ainda que houve uma redução no risco de doenças cardiovasculares e infarto do miocárdio.

As sementes de leguminosas são fontes importantes de proteínas porém, seus valores nutricionais podem ser limitados pela presença de polifenóis, entre outros fatores. Os taninos, compostos de uma complexa família de polifenóis, interagem com proteínas e enzimas digestivas, diminuindo o valor nutricional dos alimentos ingeridos (CARMONA *et al.*, 1991).

YAMADA *et al.* (1999) analisaram os efeitos dos compostos fenólicos provenientes dos alimentos sobre a liberação da histamina de células LTB<sub>4</sub> (leucotrieno B-4) do exudato peritoneal de rato e suas atividades antioxidantes foram examinadas para avaliar as atividades antialérgicas. Os resultados sugeriram que, a estrutura trifenólica do pirogalol e do ácido gálico foi essencial para a inibição da liberação da histamina. Por outro lado, a forte atividade antioxidativa dos *o*- e *p*-difenóis, catecol e hidroquinona e a permeabilidade da membrana pareceu ser essencial para a inibição de LTB<sub>4</sub>.

Procianidinas oligoméricas isoladas por DE GAULEJAC *et al.* (1999) de diferentes frações de uvas e vinhos, foram consideradas eficientes seqüestradores

de radicais livres, mesmo em baixas concentrações nos vinhos. Suas atividades nas uvas e vinhos são muito mais elevadas do que outros antioxidantes naturais comercialmente disponíveis tais como o ácido ascórbico e o ácido gálico.

PEARSON *et al.* (1999) testaram a atividade antioxidante de compostos fenólicos do suco de maçã *in vitro* e verificaram que a inclusão desta fruta e seu suco, na dieta humana, promovem benefícios à saúde.

KHOLDEBARIN & OERTLI (1994) descreveram que os compostos fenólicos possuem um efeito inibitório sobre a nitrificação. Na análise da nitrificação das soluções de culturas aeradas, observaram que os ácidos fenólicos e os cotilédones das sementes de chá pulverizados, reduzem significativamente a quantidade de nitrato produzido pela oxidação da amônia e nitrito. Concluíram então que, havia uma fixação da amônia e uma volatilização do nitrito resultando numa baixa disponibilidade de substratos para a nitrificação de bactérias.

BRESOLIN (1998) em testes qualitativos preliminares com soluções reagentes de azul-O-toluidina e fluoroglucinol-HCl (SANDER,1987), indicou a presença de compostos fenólicos tanto na solução aquosa de galactomanana das sementes Introdução 1 de *M. scabrella*, quanto após a hidrólise alcalina do polissacarídeo. A autora, a partir destes resultados, sugeriu que os referidos compostos estavam unidos ao polissacarídeo por ligação do tipo éster, rompida pela hidrólise alcalina, podendo participar do processo de escurecimento dos extrativos vegetais.

*Objetivos*

## 2.1. Objetivo Geral

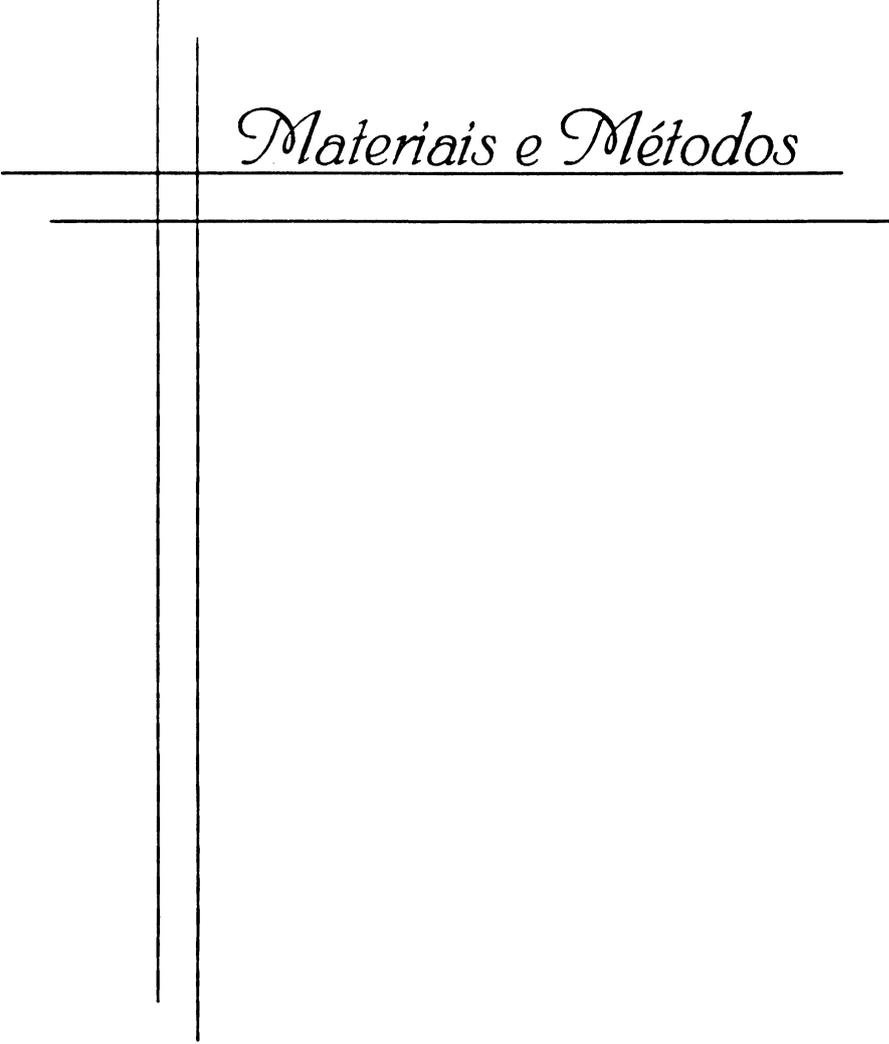
O objetivo geral do presente trabalho, consiste na análise dos carboidratos e compostos fenólicos presentes nas sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá).

## 2.2. Objetivos específicos

-Caracterização e quantificação dos carboidratos presentes nas sementes totais e amêndoas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* .

-Avaliação dos métodos de extração dos compostos fenólicos das sementes.

-Investigação dos compostos fenólicos de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* por cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa de ionização por “eletron spray” (ESI-MS), acoplado ao HPLC.



*Materiais e Métodos*

### 3.1. Materiais e Métodos Gerais

Foram utilizados reagentes e solventes de grau de pureza PA-ACS. O etanol utilizado na precipitação de polissacarídeos apresentou grau de pureza comercial.

As determinações espectrofotométricas na região do ultra-violeta (UV), foram realizadas em espectrofotômetro HITACHI, U-2001. Na região do visível, em aparelho SPECTRONIC, 20 GENESYS. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

Os açúcares totais, foram dosados pelo método de fenol-ácido sulfúrico, como descrito por DUBOIS *et al.* (1956). O princípio deste método baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre o carboidrato, retirando duas moléculas de água, formando o hidroximetilfurfural (para as hexoses) e o furfural (para as pentoses), os quais reagem com o fenol formando um complexo colorido que é medido por espectrofotometria, em 490nm e 480nm, respectivamente. Os padrões utilizados foram a manose e a arabinose em concentrações de 25 -100 µg/mL.

Para a dosagem de ácido urônico presente nas amostras foi utilizado o método de *m*-hidroxibifenil, descrito por BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, (1973). Na técnica utilizou-se 0,4 mL de amostra e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio (0,0125 M) em ácido sulfúrico concentrado, a qual foi aquecida (5min, 100°C), e posteriormente adicionou-se 40 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v). Formou-se um cromógeno que apresentou absorção em 520nm. Como o carboidrato produz um complexo colorido na presença da solução de tetraborato de Na em H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (a 100°C), utilizou-se controle negativo para cada

concentração de amostra testada, adicionando-se ao sistema 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5% m/v, ao invés da solução de *m*-hidroxibifenil (as absorbâncias desses brancos são subtraídas da absorbância total das amostras). A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva de calibração, utilizando-se concentrações de 20 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido glucurônico.

Os teores de proteínas e/ou compostos fenólicos, foram determinados pelo método HARTREE (1972), utilizando-se como padrões, albumina bovina (leitura em 650 nm ) e ácido gálico (leitura em 750nm), respectivamente em concentrações de 20 - 100  $\mu\text{g/mL}$ . O princípio do método baseia-se na formação de um complexo pela ligação do corante (Folin-Ciocalteu) à proteína e/ou aos compostos fenólicos. O reativo de Folin-Ciocalteu, utilizado nestas dosagens, faz a complexação das hidroxilas dos grupamentos fenólicos dos aminoácidos aromáticos (tirosina) portanto, os compostos fenólicos são também susceptíveis à complexação com o reativo de Folin, sendo então dosados simultaneamente (HARTREE, 1972).

Para as análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa – ESI-MS (espectrometria de massa de ionização por “eletron spray”), as amostras foram filtradas em membrana MILLIPORE com 0,22  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro.

## **3.2. Métodos Cromatográficos**

### **3.2.1. Cromatografia de partição em papel (CP) e em camada delgada (TLC)**

Os cromatogramas em papel foram realizados, utilizando-se a técnica ascendente (TREVELYAN et al., 1950) em papel Whatman nº 1, tendo como solvente a mistura benzeno: butanol: piridina: água (1:5:3:3 v/v fase superior) e como revelador, nitrato de prata.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica, foram realizadas em placas de sílicagel 60 MERCK (20 x 20 cm) (sem indicador de fluorescência) com 0,2mm de espessura, utilizando-se *p*-anisaldeído como reagente genérico para a detecção de lipídeos em geral, fenóis e açúcares. As placas de cromatografia em camada delgada preparativa (PTLC), foram confeccionadas no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Farmácia desta instituição, com sílicagel 60 MERCK (sem indicador de fluorescência) e espessura de 0,8 mm. Os solventes utilizados como fase móvel foram: tolueno: clorofórmio: acetona (40: 25: 35 v/v), utilizando câmara de UV para visualização, por fluorescência, dos compostos fenólicos.

Os padrões galangina; kempferol; ácido clorogênico; pinocembrina 7- metil éter; pinocembrina; crisina; apigenina; vanilina e ácido clorogênico, utilizados nas TLCs, foram gentilmente cedidos pelo professor José Domingos Fontana.

### **3.2.2. Cromatografia líquido gasosa (GLC)**

As análises de acetatos de alditóis foram obtidas por cromatografia em fase líquido-gasosa (GLC) (BJÖRNDAL *et al.*, 1967; KIRCHER, 1962; LÖNNGREN *et al.*, 1971; MANKARIOS, 1971; SLONEKER, 1972), realizadas em cromatógrafo HP 5890 II, com coluna capilar 30cm x 0,5mm, modelo DB-225, com detector por ionização de chama (FID) e temperaturas de 250 e 300°C para o injetor e detector, respectivamente. Nitrogênio, foi o gás de arraste, utilizado a 2mL/min. A quantificação dos picos foi obtida por integrador HP acoplado ao cromatógrafo.

### **3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

O sistema de HPLC, SHIMADZU, para a análise dos compostos fenólicos consistiu de um detector de UV modelo SPD-10A com monitoramento em 240 nm a 340nm, uma bomba modelo LC-10AD sob pressão de 67 – 68 kgf/cm<sup>2</sup> e fluxo de 1,0 mL/min, um injetor manual RHEODYNE e um forno de colunas modelo CTO-10A na temperatura de 30°C. Utilizou-se coluna SUPELCO LC- 18 (25cm x 4,6mm, 5µm), com sistema isocrático de acetonitrila: água (65:35 v/v).

### **3.3. Espectrometria de Massa – ESI-MS (Espectrometria de massa de ionização por “eletron spray”), acoplado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Para esta análise dos compostos fenólicos presentes nas sementes de *P. edulis*, utilizou-se o HPLC sob as mesmas condições citadas no item anterior,

adaptado por interface ao probe do espectrômetro de massa, MICROMASS QUATTRO LC, duplo quadrupolo no modo íon negativo, com calibração por CsI (iodeto de cério) tipo ESI-MS, fornecendo cromatogramas e espectros de massa, respectivamente. O solvente utilizado foi acetonitrila: água (65: 35 v/v).

Para a aquisição dos espectros, foi utilizado uma faixa de massa de 130 a 200 m/z, com intervalo de varredura de 0,16 s em sistema de aquisição contínuo de dados com tempo de 10 minutos. Foi utilizada uma energia de 2,6 kV no capilar para produzir a ionização.

### **3.4. Obtenção das Sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger**

As sementes foram fornecidas por FRUTEZA SUCOS NATURAIS LTDA, localizada na cidade de Dracena – SP. Estas sementes são resultantes do beneficiamento do fruto cultivado na região.

### **3.5. Obtenção dos Polissacarídeos das Semente**

As sementes foram separadas em duas partes: uma parte, após moagem em moinho WILEY, utilizando-se peneira com abertura de malha de 2mm, foi submetida à extração com tolueno:etanol (2:1 v/v) e a outra, submetida a fervura por 10 min em microondas e separadas manualmente em tegumento e amêndoa.

### **3.5.1. Extração com tolueno : etanol**

As sementes totais moídas, sofreram deslipidificação, inseridas em aparelho extrator tipo SOXHLET com tolueno:etanol (2:1 v/v), por 160 horas com 3 trocas de solventes. O extrato I resultante, foi reservado para estudo posterior e o resíduo I, foi seco em capela até a completa evaporação dos solventes.

### **3.5.2. Extrações Aquosas**

Após a deslipidificação das sementes totais e separação das amêndoas, ambas foram secas e submetidas a sucessivas extrações conforme o esquema 1 (página 32).

As sementes totais moídas e deslipidificadas (20g) e as amêndoas (11g) foram submetidas a extração aquosa a 25°C, sob agitação durante 4 horas. A dispersão foi centrifugada e o extrato concentrado em rotaevaporador. A este extrato foram adicionados 2 volumes de etanol. O precipitado (Fração I), foi submetido a lavagens com etanol e secos em estufa a vácuo. O resíduo da extração aquosa a 25°C foi submetido a extração aquosa a 80°C por 7 horas, fornecendo a Fração II como mostra o esquema 1 (página 32).

### **3.5.3. Extrações Alcalinas**

O resíduo III da extração aquosa 80°C, foi submetido à extração com NaOH 2N, a temperatura ambiente, durante 6 horas. Após centrifugação, o sobrenadante

foi acidificado com ácido acético a 50% até pH 5,0 fornecendo a hemicelulose A (Hem A) na forma precipitada. A hemicelulose B (Hem B), foi precipitada na solução com 3 volumes de etanol, lavada com etanol, seca em estufa a vácuo. O resíduo da extração alcalina 2N foi tratado com NaOH 4N e submetido ao mesmo procedimento da extração anterior.

Os produtos finais da extrações aquosas e alcalinas (frações I, II, hemiceluloses A e B de sementes totais e amêndoas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), foram submetidos à hidrólise ácida e à determinações espectrofotométricas para dosagem de açúcares totais, ácidos urônicos e proteínas, conforme descrito anteriormente.

### **3.6. Hidrólise Ácida**

As hidrólises ácidas totais (ADAMS, 1985; ASPINALL, 1982), foram realizadas em tubos Kimax, hermeticamente fechados, em banho de água fervente por 5 horas com ácido trifluoroacético (TFA) 1M. Após a hidrólise, o ácido foi removido por evaporação.

### **3.7. Redução e Acetilação dos Produtos Obtidos nas Hidrólises ácidas**

Os produtos obtidos nas hidrólises ácidas foram reduzidos (WOLFROM & THOMPSON, 1963) com NaBH<sub>4</sub>, à temperatura ambiente por 2 horas em meio

aquoso. Em seguida adicionou-se resina Lewatit S-100 ( $H^+$ ) para decompor o excesso do agente redutor e remover os cátions  $Na^+$ . Após filtração, as soluções foram concentradas até a secura. O ácido bórico remanescente foi removido por co-distilação com 2mL de metanol anidro na forma de borato de trimetila, um éster volátil. Este procedimento foi repetido 3-4 vezes para assegurar a total remoção do ácido bórico. Os alditóis resultantes, secos, foram acetilados (WOLFROM & THOMPSON, 1963) com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1 v/v) a temperatura ambiente por 14 horas. O processo foi interrompido pela adição de gelo moído e os alditóis acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada por sucessivas lavagens com  $CuSO_4$  a 5%, através da formação de um complexo azul solúvel em água, o qual foi removido. A fase clorofórmica foi lavada sucessivamente com água destilada, evaporada a temperatura ambiente e analisada por GLC.

### **3.8. Microscopia Fotônica**

As amostras das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger, foram fixadas em FAA 70% (90 partes de etanol 70°GL, 5 partes de ácido acético glacial e 5 partes de formol) (JOHANSEN, 1940).

As lâminas permanentes foram montadas a partir de amostras pós-fixadas, armazenadas em álcool 70° GL e posteriormente emblocadas em glicol metacrílico (GMA) JB4, de acordo com as especificações do fabricante Polysciences Inc. e de FELDER & O'BRIEN (1968). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo

820 SPENCER, com espessura de 8 micrômetros. A coloração foi realizada com azul de toluidina em tampão acetato pH 4,0. As lâminas foram montadas com “permount”. As fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio ZEISS, modelo MC 80. As escalas foram projetadas nas mesmas condições ópticas.

### **3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* após a fixação já mencionada, passaram por uma desidratação em série alcoólica etílica (álcool 90%, duas horas; álcool 100%, 2 horas (2x) ). As amostras foram desidratadas via ponto crítico em aparelho BALZERS, modelo CPC 010 (SILVEIRA, 1989), coladas com esmalte incolor e grafite em suporte próprio. A metalização em ouro foi efetuada em equipamento BALZERS SPUTTERING, modelo SCD 030. As eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS, modelo SEM 505.

### **3.10. Extração dos Compostos Fenólicos**

As sementes, depois de moídas em moinho WILEY com abertura de malha de 2 mm, foram submetidas à quatro processos de extração de fenólicos utilizando como solventes, HCl 1% em metanol (CARMONA *et al.*, 1991 e 1993), metanol (BOCCO *et al.*, 1998; CARMONA *et al.*, 1991 e 1993; KALLITHRAKA *et al.*, 1995), acetato de etila e hexano.

Antes do início das extrações, os solventes metanol, hexano e acetato de etila, foram previamente aquecidos em banho-maria, para potencializar a ação dos mesmos, e a dispersão deixada sob agitação por 15 horas a temperatura ambiente.

A extração realizada com HCl 1% em metanol foi realizada durante 3 horas sob agitação, sem aquecimento prévio do solvente.

Em seguida, as dispersões foram centrifugadas e os extratos, obtidos por metanol (F1); acetato de etila (F2); hexano (F3) e HCl 1% em metanol (F4) foram submetidos a secura em rotaevaporador e conservados à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

O produto final da extração com metanol (F4) foi submetido a extração de lipídeos pelo método de FOLCH *et al.* (1957, p.497). Neste processo, adicionou-se uma solução de cloreto de potássio (KCl) 0,1M ao extrato bruto lipídico, previamente solubilizado numa solução clorofórmio-metanólica. A mistura obtida foi transferida para um funil de separação, agitada vigorosamente por 3 minutos e deixada em repouso até completa separação das fases sob temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . As camadas superior e inferior foram coletadas isoladamente e analisadas qualitativamente pelo método de HARTREE (1972).

A fase inferior (clorofórmica) foi evaporada à temperatura ambiente até secura, ressuspensa em metanol, purificada em PTLC e analisada por HPLC e HPLC/ESI-MS.

## *Resultados e Discussão*

#### 4.1. Obtenção dos Polissacarídeos

A *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá), espécie nativa do Brasil e muito utilizada na industrialização de suco, gera um acúmulo considerável de suas sementes. Por este motivo, suas sementes foram escolhida como fonte de matéria prima para o presente estudo.

A confirmação da classificação botânica desta espécie foi possível através da análise de suas folhas, flores e frutos como mostra a figura 4. A identificação foi realizada pelo professor Armando C. Cervi do Departamento de Botânica desta instituição.



**Figura 4.** Frutos, flores e folhas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá)

As sementes foram moídas (40g) e tratadas com uma mistura de tolueno – etanol 2:1 v/v, em aparelho extrator tipo SOXHLET, a fim de eliminar lipídeos, ceras

e pigmentos. Procedeu-se em paralelo, com 50g de sementes, a inativação enzimática por 10 minutos em microondas antes de iniciar-se a separação das mesmas em amêndoa e tegumento.

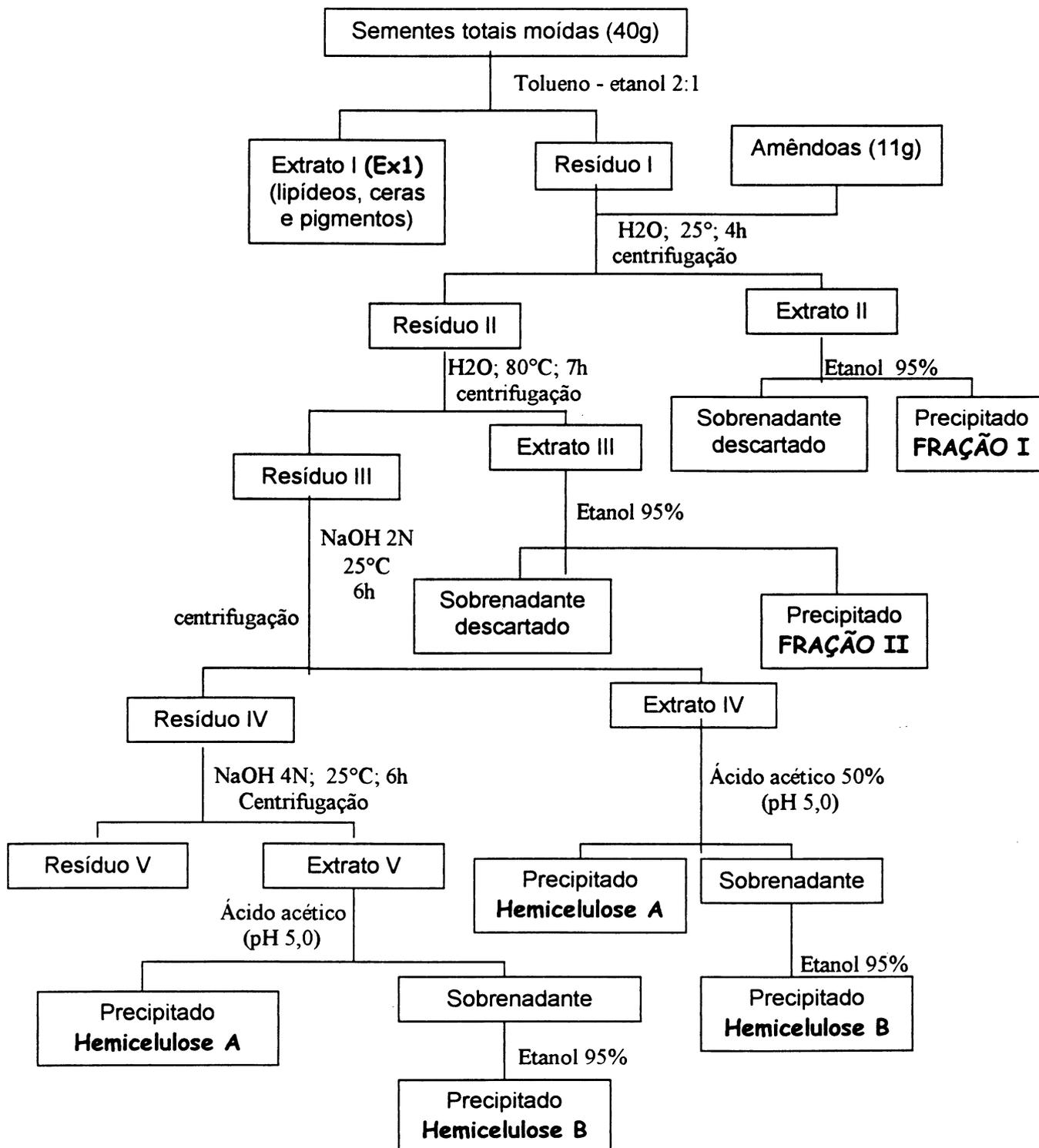
O extrato I, obtido a partir da extração com tolueno – etanol, teve um rendimento de 24,7%, podendo ser comparado aos dados descritos por CORRÊA *et al.* (1994) que encontrou 27% em teores de lipídeos para estas sementes. O resíduo I, foi extraído seqüencialmente com água a 25°C e 80°C e com NaOH 2N e 4N, como mostra o esquema 1.

As amêndoas (11g), obtidas da separação manual das sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, foram submetidas às extrações aquosas e alcalinas seguindo o mesmo esquema de extrações das sementes totais moídas e deslipidificadas (esquema 1).

A análise dos resultados presentes na tabela 2 nos mostra que, os maiores rendimentos em massa foram os obtidos através das extrações alcalinas 2N de sementes totais e amêndoas.

Sendo assim, as frações hemicelulósicas extraídas com NaOH 2N de sementes totais e amêndoas, foram selecionadas para análise quantitativa de açúcar total, ácido urônico e proteína, cujos dados apresentam-se na tabela 3.

**Esquema 1.** Processo de extração dos polissacarídeos de sementes totais e amêndoa de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger



**Tabela 2.** Rendimentos em massa das frações obtidas por extrações das sementes totais e amêndoas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Fração	Solv.	Temp.	Rend. Total % (m/m)
I <sup>s</sup>	H <sub>2</sub> O	25°C	1,43
I <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	25°C	0,5
II <sup>s</sup>	H <sub>2</sub> O	80°C	0,23
II <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	80°C	0,04
Hem A <sup>s</sup>	NaOH 2N	25°C	4,58
Hem A <sup>a</sup>	NaOH 2N	25°C	1,46
Hem B <sup>s</sup>	NaOH 2N	25°C	1,85
Hem B <sup>a</sup>	NaOH 2N	25°C	0,9
Hem A <sup>s</sup>	NaOH 4N	25°C	1,60
Hem A <sup>a</sup>	NaOH 4N	25°C	1,15
Hem B <sup>s</sup>	NaOH 4N	25°C	0,36

<sup>a</sup> amêndoa; <sup>s</sup> sementes totais

A fração Hem B<sup>s</sup> apresentou o maior teor de açúcar e ácido urônico. No entanto, nenhuma das frações apresentou valor em açúcar total significativo (tabela 3).

Os valores de proteína, elevados para quase todas as frações, nos sugerem que estes possam ser contaminações das proteínas provenientes do embrião ou que estas dosagens, utilizando o método HARTREE (1972), possam estar superestimadas pela presença de compostos fenólicos constituintes ou não da

lignina. O reativo de FOLIN-CIOCALTEAU utilizado nestas dosagens, faz a complexação das hidroxilas dos grupamentos fenólicos dos aminoácidos aromáticos (tirosina) portanto, os compostos fenólicos são também susceptíveis a complexação com o reativo de FOLIN – CIOCALTEAU, interferindo no método de HARTREE.

**Tabela 3.** Determinação das dosagens de açúcar total, ácido urônico e proteína das frações hemicelulósicas (álcali 2N), obtidas das sementes totais e amêndoas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Fração	Concentração % (m/m)			
	Rend. Total	Açúcar total <sup>D</sup>	Ácido urônico <sup>B</sup>	Proteína <sup>H</sup>
Hem A <sup>S</sup>	4,58	3,9	0,6	70
Hem B <sup>S</sup>	1,85	15,2	4,5	85
Hem A <sup>A</sup>	2,57	2,6	2,0	57
Hem B <sup>A</sup>	1,54	2,4	0,4	28

Extração a 25°C

<sup>S</sup> sementes totais; <sup>A</sup> amêndoa; <sup>D</sup> Dubois *et al.* (1956); <sup>B</sup> Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973); <sup>H</sup> Hartree (1972)

Todas as frações obtidas, conforme demonstrado no esquema 1, foram hidrolisadas, reduzidas e analisadas por GLC na forma de acetato de alditóis cujos dados apresentam-se na Tabela 4.

Com relação à composição monossacarídica, as frações de sementes totais e amêndoas, obtidas por extração aquosa a 25°C, nos mostraram a manose e a galactose como principais componentes monossacarídicos, sugerindo que poderia tratar-se de uma galactomanana. No entanto, a composição monossacarídica das amêndoas, onde pretendia-se através da separação do tegumento eliminar possíveis

contaminações de arabinoxilanas (STEPHEN, 1983) geralmente presentes, os componentes monossacarídicos de xilose (14,48%), arabinose (18,19%) e glucose (9,14%), foram maiores do que os valores encontrados nas sementes totais, respectivamente, 7,88%; 11,46% e 2,36%; sugerindo a presença de mais de um polissacarídeo.

A extração aquosa a 80°C das sementes totais, como das amêndoas, apresentou as mesmas características da extração a 25°C, isto é, os rendimentos em manose (29,33%) e galactose (33,57%), foram maiores nas sementes totais e as proporções de arabinose (20,64%) e xilose (13,07%) foram maiores nas frações obtidas das amêndoas. Vale a pena ressaltar que, fucose e ramnose só foram encontradas na frações das extrações aquosas 25 e 80°C das amêndoas.

As frações Hem A e Hem B, obtidas por extração alcalina 2N das sementes inteiras, apresentaram diferenças na composição monossacarídica de arabinose (20,37 e 30,36%) e fucose (19,13 e 4,49%), respectivamente. Porém, a composição monossacarídica entre os demais açúcares, foi semelhante.

Já nas extrações alcalinas 4N, as diferenças entre Hem A e Hem B, só foram significativas entre galactose (16,79 e 12,17%), glucose (21,83 e 27,87%) e fucose (7,19 e 3,43%), respectivamente.

Nas extrações alcalinas 2N das amêndoas, as frações Hem A e Hem B apresentaram composição monossacarídica semelhante, conforme mostra a tabela 4. No entanto, somente para as frações Hem B 2N e Hem A 4N, foi observado a presença de aproximadamente 3% de ramnose e 3% de fucose.

**Tabela 4.** Composição monossacarídica das frações obtidas a partir das extrações das sementes totais e amêndoas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá)

Fração	Solv.	Temp.	Mol <sup>al</sup> %						
			Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Fuc
I <sup>s</sup>	H <sub>2</sub> O	25°C	-	11,46	7,88	36,24	42,06	2,36	-
I <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	25°C	1,98	18,19	14,48	24,48	28,65	9,14	3,08
II <sup>s</sup>	H <sub>2</sub> O	80°C	-	14,68	11,28	29,33	33,57	11,14	-
II <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	80°C	3,39	20,64	13,07	28,44	20,06	11,45	2,95
Hem A <sup>s</sup>	NaOH 2N	25°C	-	20,37	14,84	10,22	16,75	18,69	19,13
Hem A <sup>a</sup>	NaOH 2N	25°C	-	13,24	14,13	42,39	11,59	18,65	-
Hem B <sup>s</sup>	NaOH 2N	25°C	4,12	30,36	16,63	10,56	15,58	18,26	4,49
Hem B <sup>a</sup>	NaOH 2N	25°C	3,32	11,77	13,41	40,14	9,90	17,60	3,86
Hem A <sup>s</sup>	NaOH 4N	25°C	4,47	15,20	21,07	13,45	16,79	21,83	7,19
Hem A <sup>a</sup>	NaOH 4N	25°C	2,31	29,72	16,35	17,18	17,62	14,05	2,77
Hem B <sup>s</sup>	NaOH 4N	25°C	2,43	18,39	23,77	11,94	12,17	27,87	3,43

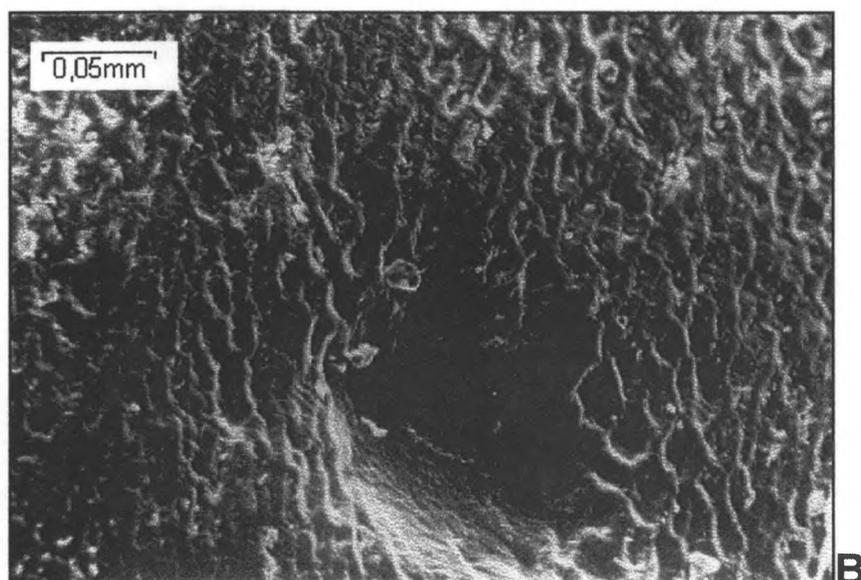
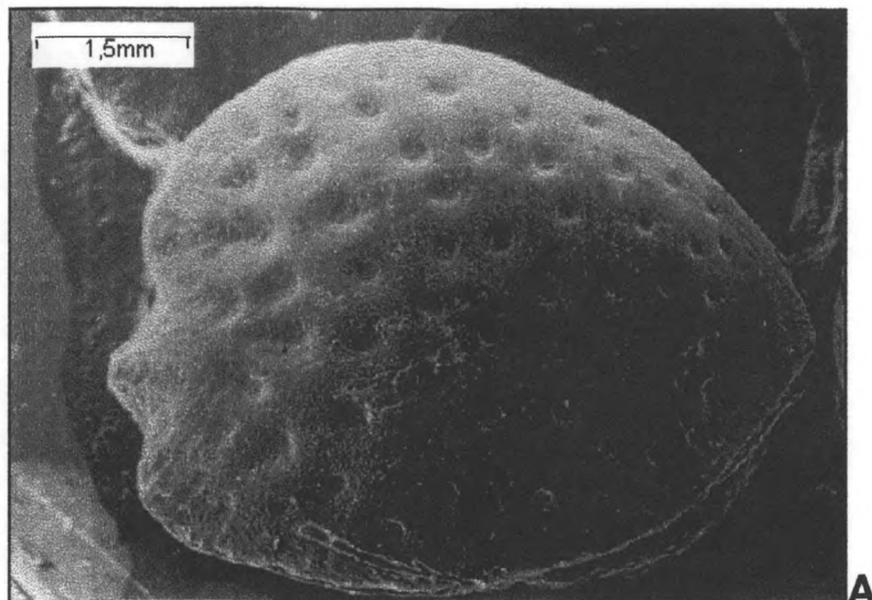
<sup>al</sup> Acetatos de alditóis analisados por GLC; <sup>a</sup> Amêndoas; <sup>s</sup> Sementes.

A análises por cromatografia em papel das frações hidrolisadas e a dosagem colorimétrica pelo método de Blumenkrantz & Asboe-Hansen, evidenciou a presença de ácido urônico nestas amostras (tabela 3), o que nos sugere a presença de polissacarídeos ácidos nestas frações hemicelulósicas.

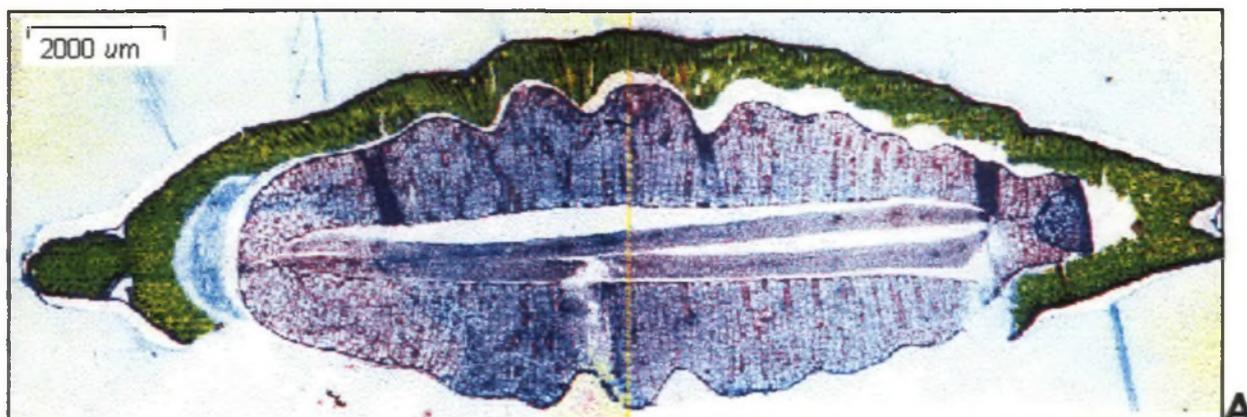
#### **4.2. Análise Microscópica das Sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa***

As sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, onde observou-se que as mesmas apresentavam-se comprimidas lateralmente, com superfície reticulada mais ou menos verrucosa, condizendo com a descrição efetuada por BARROSO *et al.* (1999), para a família Passifloraceae (Figura 5).

Secções transversais da semente desta espécie, revelaram um tegumento esclerificado, constituído por células alongadas, de paredes espessadas, lignificadas, contendo compostos fenólicos conforme demonstrado nas figuras 6 e 7. Os compostos fenólicos podem ser melhor evidenciados na figura 7, através da cor verde característica da coloração efetuada com azul de toluidina. A presença de taninos foi descartada pois não havia a presença de grumos característicos evidenciados por esta mesma coloração (FELDER & O'BRIEN, 1968). A amêndoa apresenta um endosperma constituído por vários estratos celulares, contendo substâncias ergásticas no interior de suas células (possivelmente óleo), bem como um embrião com dois cotilédones alongados quando em secção transversal (Figuras 6, 8 e 9).



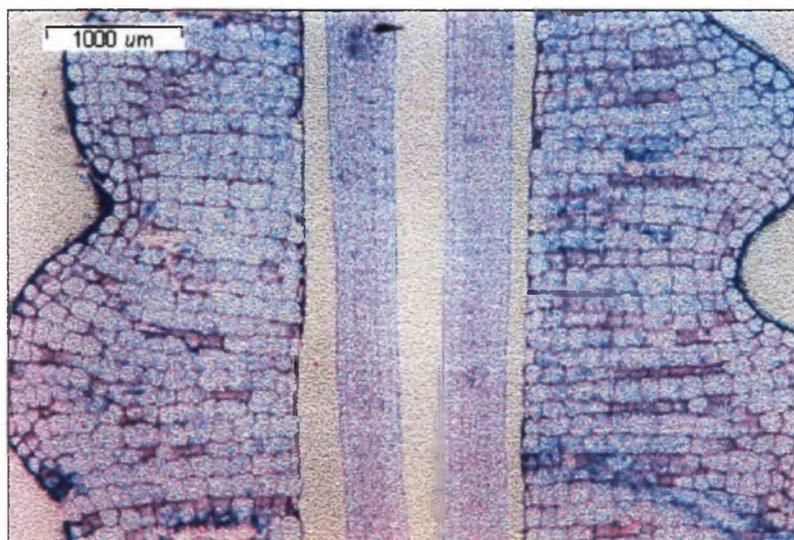
**Figura 5.** A) Vista geral da superfície da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (microscopia eletrônica de varredura = MEV); B) Detalhe do poro da figura anterior



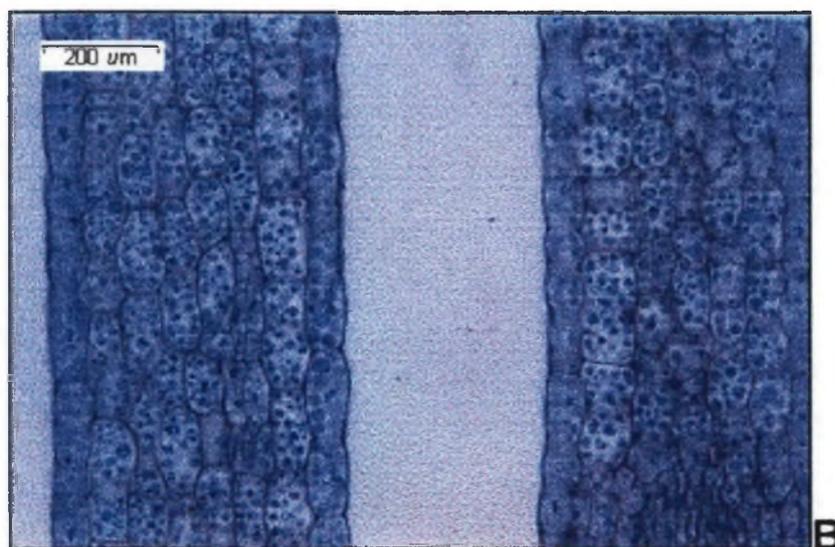
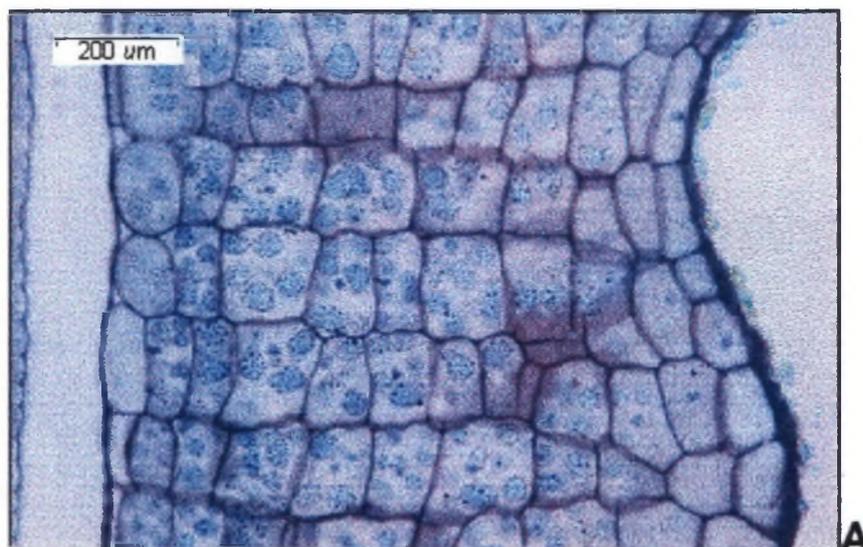
**Figura 6.** **A)** Vista geral por microscopia fotônica (MF) da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal, utilizando coloração de azul de toluidina; **B)** Detalhe da região central mediana em secção transversal (MF)



**Figura 7.** Tegumento da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF), evidenciando lignina em amarelo-esverdeado e compostos fenólicos em verde



**Figura 8.** Componentes da amêndoa de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF)



**Figura 9.** **A)** Detalhe do endosperma de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em secção transversal (MF); **B)** Detalhe dos cotilédones em secção transversal (MF)

Tendo em vista, a identificação dos compostos fenólicos nos cortes observados por microscopia fotônica (Figuras 6 e 7) e as análises colorimétricas realizadas nas sementes totais, indicando um baixo teor em açúcar total e um elevado teor de proteína, podendo este último estar superestimado pela presença de compostos fenólicos, conforme demonstrado na tabela 3, iniciamos a investigação dos compostos fenólicos presentes nas sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

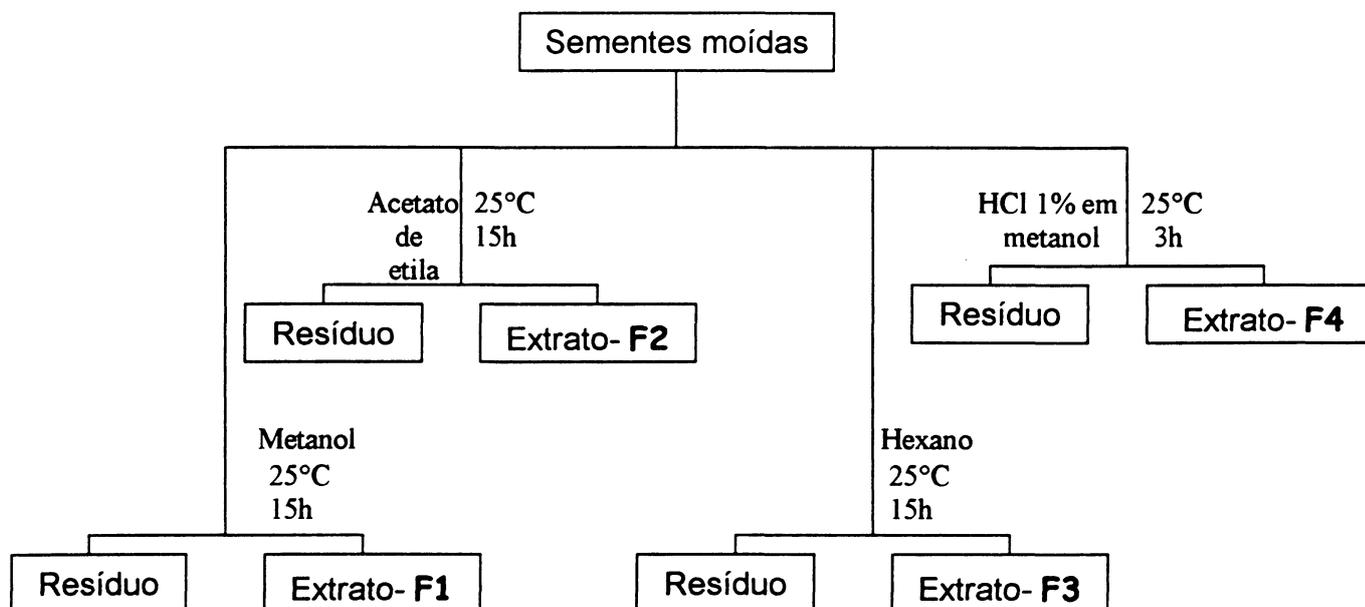
### **4.3. Análise dos Compostos Fenólicos**

Para extração dos compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, foram utilizados os seguintes solventes: metanol; acetato de etila; hexano e HCl 1% em metanol como mostra o esquema 2.

Ensaio preliminares, foram realizados para escolher o melhor tempo de extração com HCl 1% em metanol onde verificou-se que, o rendimento obtido com 5 extrações seqüenciais por 1 hora foi semelhante à uma única extração de 3 horas, o que nos levou a adotar a último procedimento para a extração dos compostos fenólicos.

Após cada extração, a dispersão foi centrifugada e separada em resíduo e extrato (F1; F2; F3; F4), em seguida, estes extratos foram evaporados e mantidos na temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , para evitar a oxidação dos produtos obtidos.

**Esquema 2.** Processos de extração de compostos fenólicos a partir das sementes totais de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá)



Os fenóis são freqüentemente alvos de oxidações enzimáticas e esses compostos podem ser degradados durante os processos de isolamento, devido a ação de fenolases presentes em extratos de plantas (HARBORNE, 1984).

Segundo CARMONA *et al.* (1991) a mistura de HCl 1% em metanol tem sido descrita como o mais eficiente solvente para a extração de polifenóis (taninos) de sorgum (MAXON AND ROONEY, 1972), grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e feijão andú (*Cajanus cajan*), quando comparado com metanol puro.

Para testar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos da casca e das sementes de frutas cítricas, BOCCO *et al.* (1998) testaram os extratos obtidos da extração com metanol (flavonas e flavanonas glicosiladas) e com hidrólise alcalina

(ácidos fenólicos e flavonóis).

KALLITHRAKA *et al.* (1995) testaram metanol, acetona 70% e etanol 75% para extração de compostos fenólicos das sementes de uva. O metanol foi o melhor solvente para extração de (+)-catequina, (-)-epicatequina e epigallocatequina; a acetona 70% extraiu procianidinas e o etanol 75% extraiu ácido gálico.

Para avaliar a eficiência dos diferentes métodos de extração, realizou-se uma análise quantitativa dos compostos fenólicos utilizando o método descrito por HARTREE (1972), pois o mesmo mostrou-se reprodutível nas dosagens de fenólicos. Utilizou-se como padrão o ácido gálico. Os dados desta análise estão presentes na tabela 5.

**Tabela 5.** Análise comparativa das diferentes extrações dos fenólicos totais das sementes totais de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Solvente	Tempo (horas)	Concentração % (m/m)	
		Rendimento	Compostos fenólicos <sup>H</sup>
HCl 1% metanol	3	1,40	2,85
metanol	15	1,67	55,6
acetato de etila	15	0,18	0,61
hexano	15	0,24	0,78

<sup>H</sup> Hartree (1972)

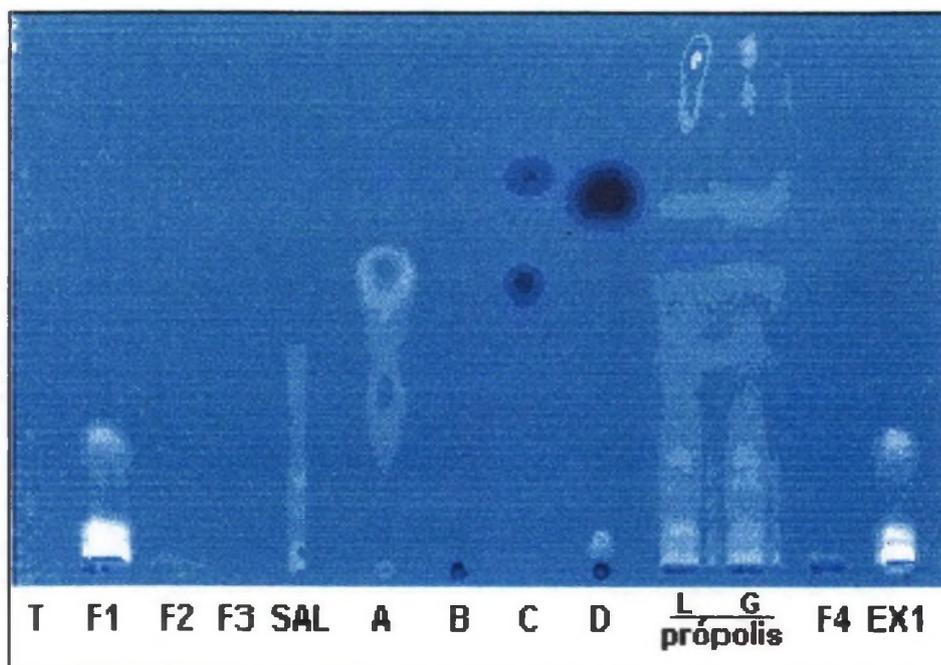
A partir dos resultados demonstrados na tabela 5, observou-se que, o melhor rendimento correspondia à fração metanólica, assim como, a maior concentração em compostos fenólicos

A maioria dos compostos fenólicos apresentam uma intensa absorção na região ultra-violeta do espectro onde são visivelmente coloridos pela emissão de fluorescência (RIBÉREAU-GAYON, 1971).

Os extratos F1; F2; F3; F4 (esquema 2) e Ex1(esquema 1), foram analisados comparativamente por visualização em UV e revelação por *p*-anisaldeído em TLC como mostram as figuras 10 e 11, respectivamente.

Por análise em UV, não foi possível relacionar as amostras (F1; F2; F3; F4) com os padrões selecionados: ácido transcinâmico; ácido salicílico; galangina; kempferol; quercetina; ácido ferúlico; ácido gálico; ácido clorogênico; pinocembrina 7-metil éter; pinocembrina; crisina; apigenina; vanilina e ácido clorogênico mas, as fluorescências presentes nas amostras F1 e Ex1, sugerem que a extração realizada com metanol foi aquela que permitiu a identificação dos compostos fenólicos. A extração realizada com tolueno:etanol (2:1 v/v) utilizada para a deslipidificação das sementes totais previamente às extrações aquosas e alcalinas realizadas para obtenção de carboidratos (Ex1), também contribuiu para a extração destes compostos.

As amostras de própolis foram utilizadas como padrão de flavonóides e ácidos fenóis carboxílicos.

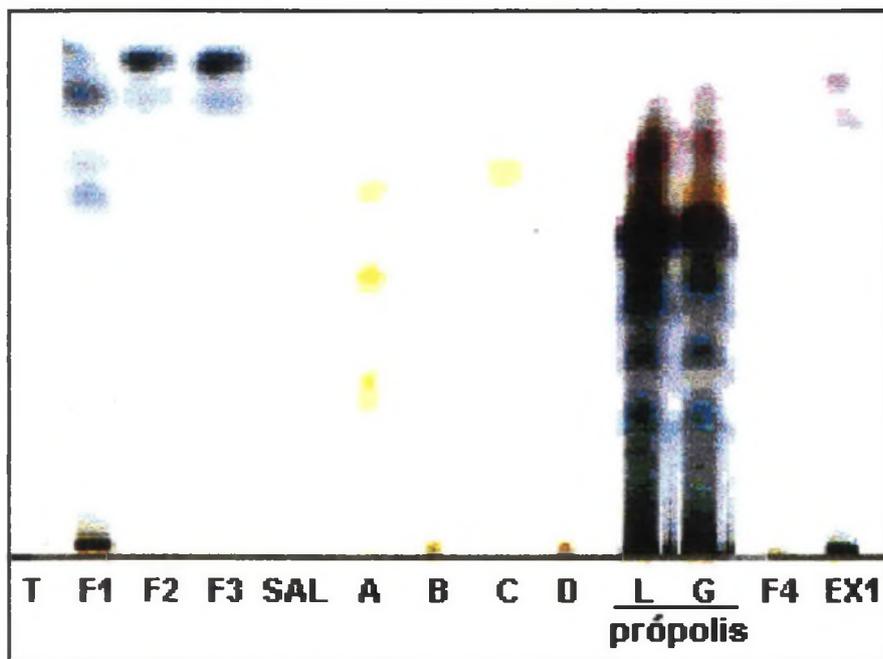


**Figura 10.** Cromatografia em camada delgada das extrações de compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, visualizada por UV

Amostras: F1- metanol; F2- acetato de etila; F3- hexano; F4- HCl 1% em metanol; Ex1- tolueno/etanol (2:1).

Padrões: T- ácido transcinâmico; SAL- ácido salicílico; A= galangina, kempferol, quercetina; B= ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogênico; C= pinocembrina 7- metil éter, pinocembrina, crisina, apigenina; D= vanilina e ácido clorogênico

Com a finalidade de avaliar a relação entre os fenólicos e açúcares, a mesma placa foi revelada com *p*-anisaldeído (figura 11). A revelação não permitiu relacionar nenhum dos padrões selecionados com os extratos F1; F2; F3 e F4, no entanto, observou-se que as manchas fluorescentes identificadas por UV e indicativas de compostos fenólicos das frações F1 e Ex1, foram coincidentes nesta revelação.



**Figura 11.** Cromatografia em camada delgada das extrações de compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, revelada com *p*-anisaldeído

Amostras: F1- metanol; F2- acetato de etila; F3- hexano; F4- HCl 1% em metanol; Ex1- tolueno/etanol (2:1).

Padrões: T- ácido transcinâmico; SAL- ácido salicílico; A= galangina, kempferol, quercetina; B= ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogênico; C= pinocembrina 7- metil éter, pinocembrina, crisina, apigenina; D= vanilina e ácido clorogênico

Os resultados obtidos por TLC, confirmam aqueles obtidos por análise colorimétrica, comprovando que a extração com metanol foi a mais eficiente para a obtenção dos compostos fenólicos. A partir destes dados, foi realizada a purificação da fração obtida com metanol (F1).

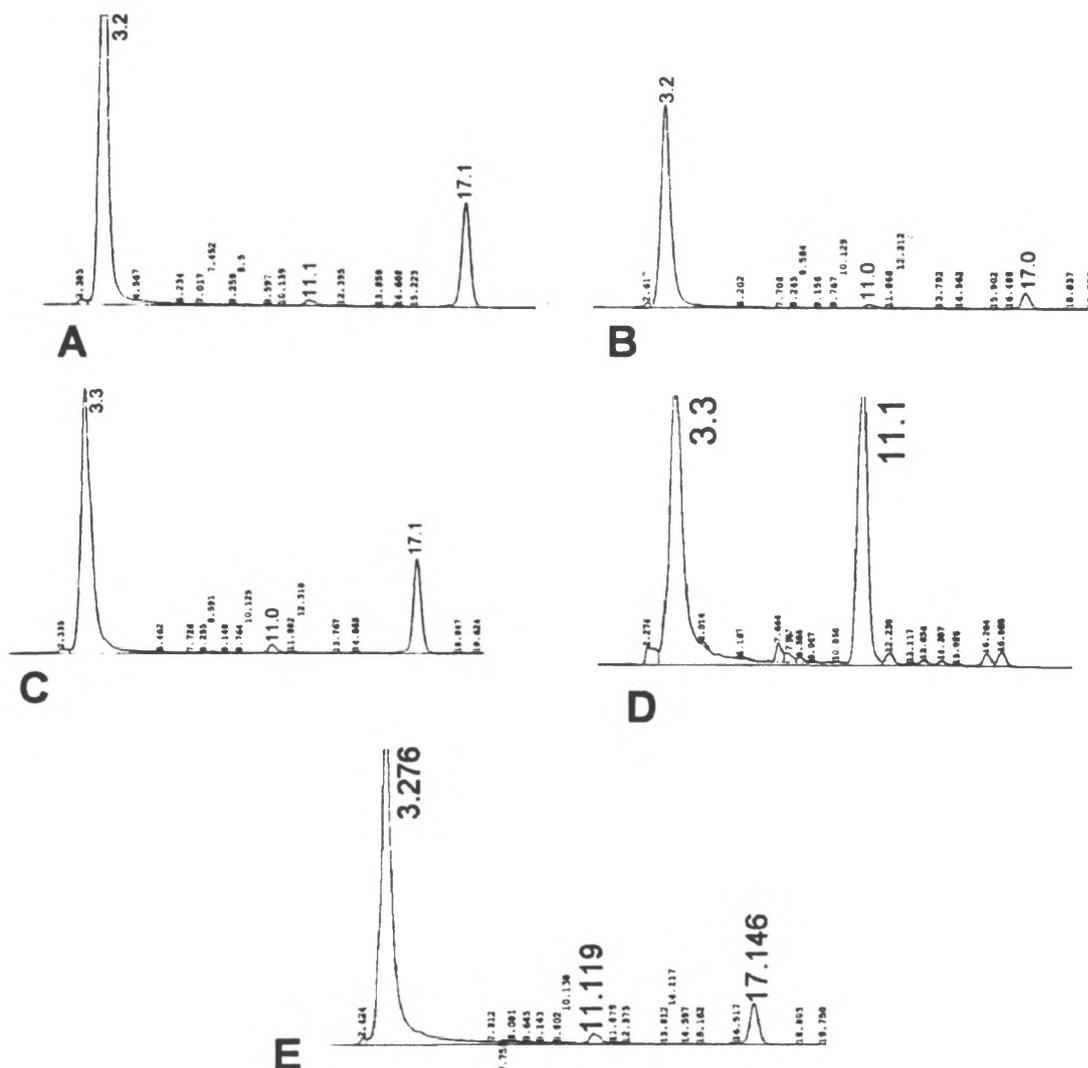
Devido à quantidade significativa de lipídeos presentes nesta fração, realizou-se a partição proposta por FOLCH *et al.* (1957). Através deste processo,

adicionando-se solução de cloreto de potássio ao extrato bruto lipídico, previamente solubilizado numa solução clorofórmio-metanólica, obteve-se a redistribuição dos componentes presentes no extrato, em um sistema de duas fases, conhecidas como fases superior e inferior de FOLCH. Na fase superior, constituída basicamente de solução salina, metanol e quantidades diminutas de clorofórmio, concentram-se as substâncias de maior polaridade. A fase inferior, consiste basicamente de clorofórmio, nela permanecem as substâncias mais hidrofóbicas ou apolares, ou seja, os lipídeos em geral. Substâncias de caráter anfipático tendem a posicionarem-se na interface do sistema ou, se ionizadas, tendem a migrarem para a fase superior. Com relação aos compostos fenólicos, esperava-se que os mesmos migrassem para a fase superior ou metanólica, no entanto, por uma análise qualitativa da fração superior e inferior realizada pelo método de HARTREE, observou-se a presença destes compostos na fração inferior. Assim, decidiu-se evaporar o clorofórmio e ressuspender o extrato em metanol.

Este extrato, após o tratamento pelo método de FOLCH, foi submetido à análise por GLC onde comprovou-se a presença de 31% de açúcares e 69% de glicerol (provavelmente, proveniente da fração lipídica). Dentre os açúcares estavam: Ram (1,71%); Xil (4,23%); Man (2,33%); Gal (1,76%) e Glu (21,0%). O valor significativo de glicerol, encontrado no extrato metanólico após a evaporação da fase clorofórmica, indica que o método não foi suficiente para eliminação dos lipídeos provenientes da amêndoa das sementes de maracujá.

Com a finalidade de proceder uma melhor purificação deste extrato, o mesmo foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa (PTLC) onde obteve-

se cinco frações distintas, identificadas por colorações características sob análise em câmara de UV na seguinte ordem ascendente: verde (FV), amarelo (FA), amarelo claro (FAC), alaranjado (FL) e roxa (FR). Cada uma destas frações, foram isoladas e submetidas a análise por HPLC conforme os cromatogramas da figura 12.



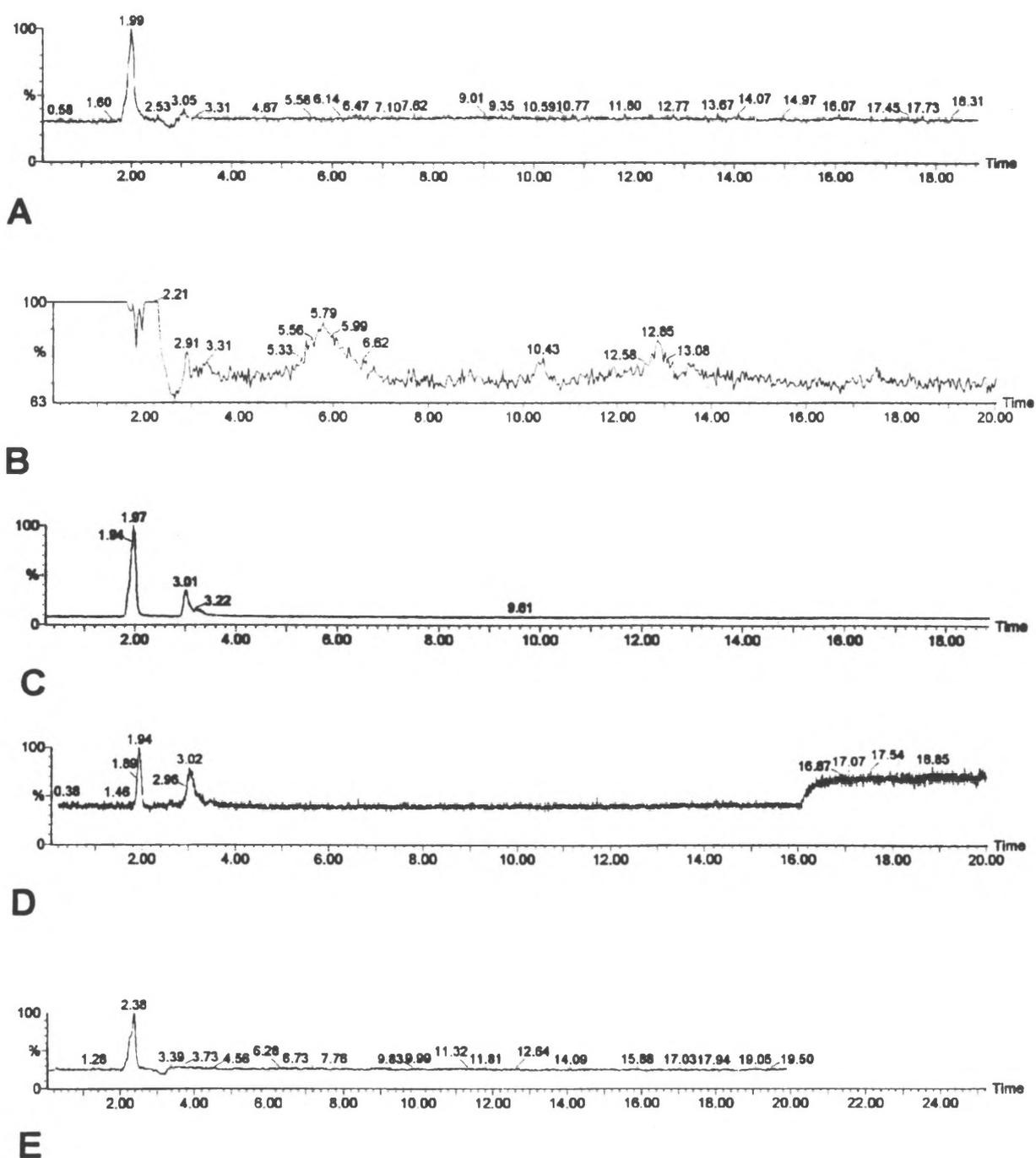
**Figura 12.** Perfis cromatográficos por HPLC, utilizando como solvente acetonitrila:água (65:35 v/v) e comprimento de onda de 240nm, a partir dos extratos purificados de semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* por PTLC: **A)** fração FV; **B)** fração FA; **C)** fração FAC; **D)** fração FL e **E)** fração FR

A partir das análises por HPLC demonstradas na figura 12, detectou-se picos majoritários nos tempos de retenção de 11,1 min e 17,1 min em todas as frações (FV; FA; FAC; FL e FR) vale ressaltar que a fração FL apresentou o pico em 11,1 min mais significativo que as demais.

No entanto, nenhum destes compostos foi possível relacionar ao tempo de retenção dos padrões, ácido gálico 3,2 min; ácido salicílico 3,9 min; ácido ferúlico 3,3 min; catecol, 3,5 min; quercetina 3,8 min e ácido trancinâmico 4,0 min, utilizados.

Procedeu-se então, a investigação dos compostos fenólicos, através da técnica de espectrometria de massa de ionização por "eletron spray" (ESI-MS), acoplado a cromatografia líquida gasosa de alta eficiência (HPLC) para tentar evidenciar a presença de compostos fenólicos nas frações utilizando como padrões, catecol, ácido gálico, ácido salicílico e ácido ferúlico. No entanto, nenhum destes padrões correspondeu ao único pico obtido nas frações FV e FR nos tempos de retenção de 1,99 e 2,38, respectivamente. Nas frações FL e FAC, também observou-se a presença do pico de 1,99 como mostram os seguintes espectros (figura 13).

Esta análise confirmou a presença do ácido salicílico e ácido ferúlico, porém não foi possível quantificá-los.



**Figura 13.** Espectros dos extratos de semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, purificados por PTLC, obtidos a partir dos íons moleculares detectados pelo ESI-MS: **A)** fração FV; **B)** fração FA; **C)** fração FAC; **D)** fração FL e **E)** fração FR

Vale a pena ressaltar que o ácido ferúlico possui uma forte atividade inibitória sobre a germinação das sementes de alface, trigo, capim-de-rebanho e amaranto verde (LI *et al.*, 1992 e LEVIMINZI *et al.*, 1994).

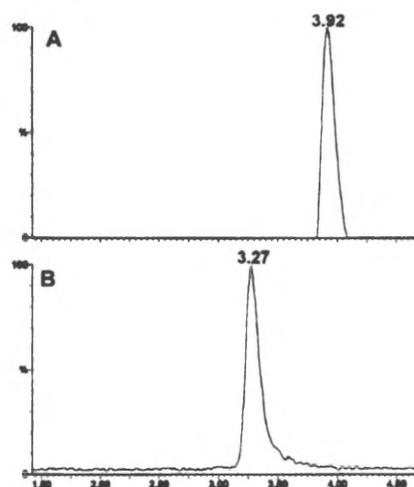
O ácido salicílico como descreve ainda LEVIMINZI *et al.* (1994) é um inibidor da germinação das sementes de trigo.

A presença do ácido salicílico em várias espécies de plantas, está fortemente associada a indução dos mecanismos de defesa das mesmas, contra vários tipos de patógenos. Os níveis de ácido salicílico aumentam drasticamente quando da ação do patógeno. A expressão de um gene bacteriano que codifica a hidroxilase salicilato (a qual degrada o ácido salicílico a catecol) em plantas transgênicas, aumenta a susceptibilidade à doenças por vírus, bactérias e fungos, supressão dos mecanismos de defesa como a acumulação das proteínas relacionadas a patogêneses ( PR- proteína) e atenuação do sistema de resistência adquirido (WALTON, 1997).

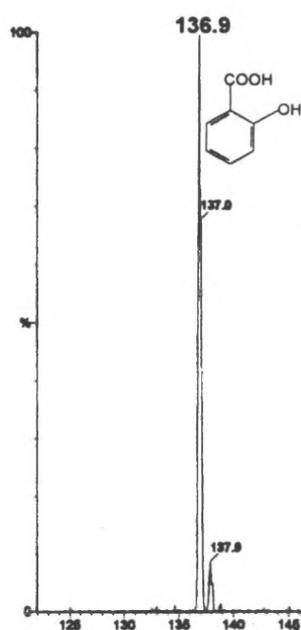
O termo proteínas relacionadas a patogêneses (PR-), é usado para incluir todas as proteínas antimicrobianas de plantas, que são induzidas pelo ataque de patógenos ou outros estresses. As PR- proteínas podem ser induzidas por etileno e ácido salicílico e por vários elicitores ( WALTON, 1997).

Sendo assim, procedeu-se a análise por espectrometria de massa – ESI-MS (modo íon negativo) realizando a busca de compostos fenólicos nas frações, utilizando os padrões ácido gálico; ácido salicílico; ácido ferúlico e catecol. Estes padrões foram injetados no HPLC e detectados por UV e MS. Tal procedimento foi realizado para estabelecer as melhores condições de ionização descritas em

materiais e métodos (página 24). As figuras 14 e 16 mostram os cromatogramas de HPLC com os detectores de UV e MS dos padrões de ácido salicílico e ácido ferúlico, os espectros de massa obtidos correspondem as figuras 15 e 17 respectivamente.



**Figura 14.** Cromatograma de HPLC do ácido salicílico, obtido por detecção de: A) UV B) ESI-MS



**Figura 15.** Espectro de massa – ESI-MS do padrão de ácido salicílico (modo negativo)

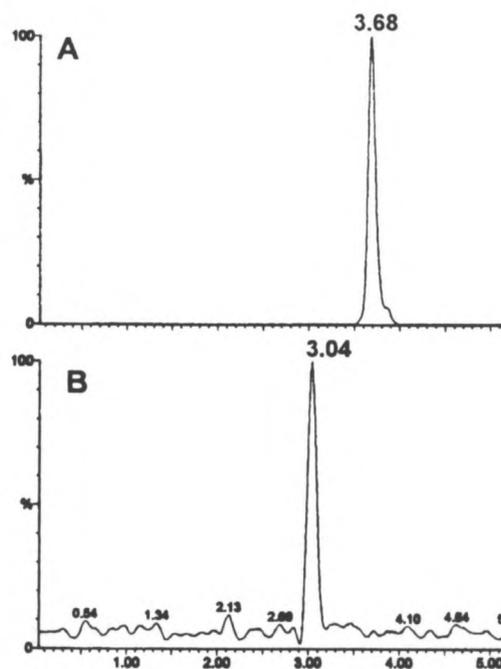


Figura 16. Cromatograma de HPLC do ácido ferúlico, obtido por detecção de: A) UV B) ESI-MS

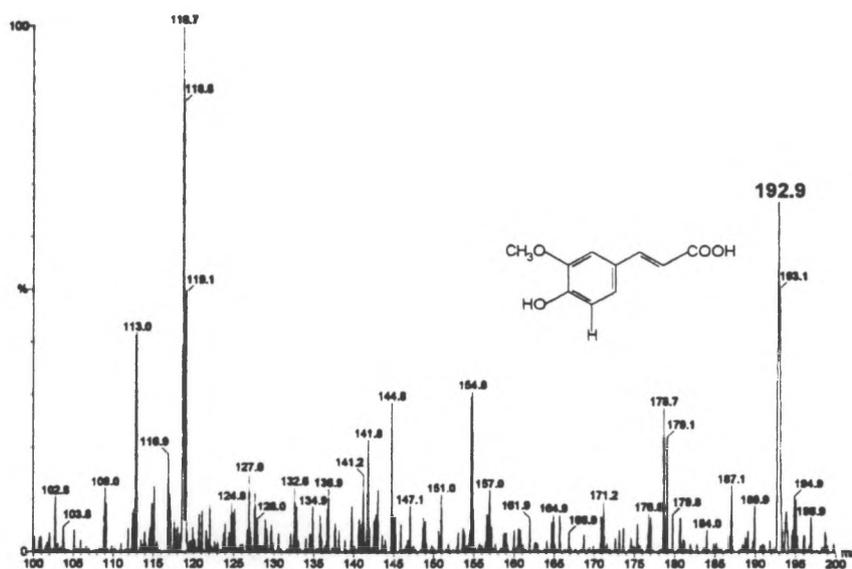
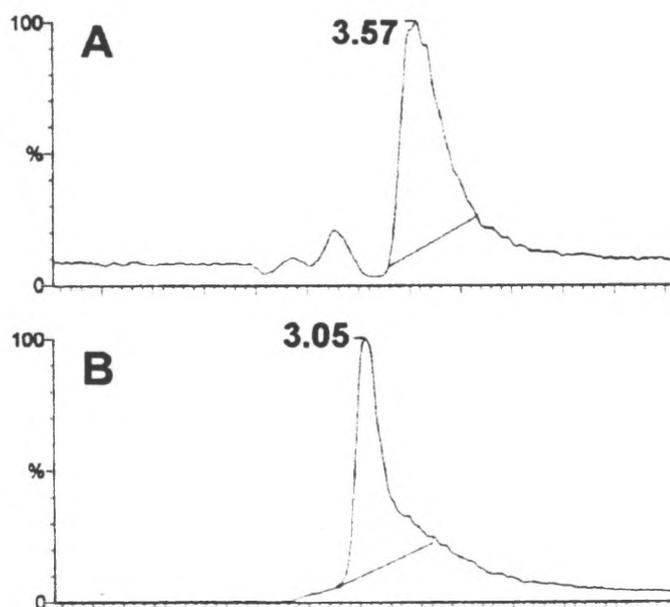


Figura 17. Espectro de massa – ESI-MS do padrão de ácido ferúlico (modo negativo)

A partir do cromatograma (figura 18), realizado por espectrometria de massa - ESI-MS, tendo como padrão interno, ácido gálico, uma vez que este não foi evidenciado em nenhuma fração, pode-se quantificar a presença de ácido salicílico correspondendo aos seguintes valores nas frações: FV 0,04% (m/m); FA 0,07% (m/m); FAC 0,015% (m/m); FL 0,004% (m/m) e FR 0,13% (m/m). A presença de ácido ferúlico foi evidenciada nas frações FA; FAC e FL, no entanto, a quantificação foi de apenas traços.



**Figura 18.** Cromatogramas do ácido salicílico e ácido gálico, obtidos a partir dos íons detectados na fração FV por ESI-MS: **A)** íon molecular 137, referente ao ácido salicílico e **B)** íon molecular 169, referente ao padrão interno (ácido gálico).

Este mesmo perfil de espectrometria de massa foi identificado para as frações FA; FAM; FL e FR.

Tendo em vista os resultados obtidos por TLC, PTLC e HPLC, foi possível evidenciar a presença de compostos fenólicos nas sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger. Através da análise por espectrometria de massa – ESI-MS (modo negativo), obtida como mostrado no cromatograma de massa (figura 18), foi possível caracterizar a presença do pico do íon pseudo molecular de massa 137 m/z, correspondente a m/z da unidade de ácido salicílico, nas sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger.

A partir da literatura descrita por LI *et al.* (1992), LEVIMINZI *et al.* (1994) e WALTON (1997), a ação destes compostos nas sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* poderiam estar associados aos mecanismos de defesa das mesmas.

*Conclusões*

- Através do processo de deslipidificação com tolueno:etanol (2:1 v/v), das sementes totais de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, obteve-se um rendimento de 24,7% em lipídeos, podendo ser comparado aos dados descritos por CORRÊA *et al.* (1994), que encontrou 27% em teores de lipídeos para estas sementes.
- As extrações alcalinas 2N das sementes totais e amêndoas de *P. edulis* apresentaram-se superiores as extrações alcalinas 4N e aquosas.
- As frações hemicelulósicas 2N de sementes totais e amêndoas de *P. edulis*, Hem A<sup>s</sup> ; Hem B<sup>s</sup> ; Hem A<sup>a</sup> ; Hem B<sup>a</sup>, apresentaram concentrações elevadas de proteína e/ou compostos fenólicos de 70%, 85%, 57% e 28%, respectivamente. Estas mesmas frações apresentaram concentrações pouco significativas em açúcar total 3,9; 15,2; 2,6 e 2,4, respectivamente.
- A análise por GLC das frações de sementes totais e amêndoas, obtidas por extração aquosa a 25°C, mostraram a manose (36,24% e 24,48%) e galactose (42,06% e 28,65%), respectivamente, como os principais componentes monossacarídicos.
- A extração aquosa a 80°C das sementes totais como das amêndoas, apresentou as mesmas características da extração a 25°C, isto é, os rendimentos em manose (29,33%) e galactose (33,57%), foram maiores nas

sementes totais e as proporções de arabinose (20,64%) e xilose (13,07%) foram maiores nas frações obtidas das amêndoas.

- As frações Hem A e Hem B, obtidas por extração alcalina 2N das sementes totais, apresentaram diferenças na composição monossacarídica de arabinose (20,37 e 30,36%) e fucose (19,13 e 4,49%), respectivamente. Porém, a composição monossacarídica entre os demais açúcares, foi semelhante.
- As frações Hem A e Hem B, obtidas das extrações alcalinas 2N das amêndoas, apresentaram composição monossacarídica de Ara 13,25% e 11,77%; Xil 14,13% e 13,41%; Man 42,39% e 40,14%; Gal 11,56% e 9,90%; Glu 18,65% e 17,60%, respectivamente. No entanto, somente para as frações Hem B 2N e Hem A 4N, foi observado a presença de aproximadamente 3% de ramnose e 3% de fucose.
- A partir da análise por microscopia fotônica, foi observado que o tegumento das sementes de *P. edulis* era esclerificado, constituído por células alongadas, de paredes espessadas, lignificadas e pode-se evidenciar a presença de compostos fenólicos. A amêndoa, apresentou um endosperma constituído por vários estratos celulares, contendo substâncias ergásticas no

interior de suas células (possivelmente óleo), bem como um embrião com dois cotilédones alongados quando em secção transversal.

- Após a extração dos compostos fenólicos por diferentes solventes (acetato de etila 0,61%; hexano 0,78 %; HCl 1% em metanol 2,85%; e o metanol 55,6%) observou-se que a extração com metanol das sementes de *Passiflora edulis*, foi a mais eficiente.
- A partir da análise de TLC por UV, observou-se a presença de compostos fenólicos somente na fração metanólica e extrato lipídico (tolueno:etanol 2:1 v/v).
- O extrato metanólico, após tratamento pelo método de FOLCH, foi analisado por GLC e comprovou-se a presença de 31% de açúcares e 69% de glicerol (provavelmente, proveniente da fração lipídica). Dentre os açúcares estavam: Ram (1,71%); Xil (4,23%); Man (2,33%); Gal (1,76%) e Glu (21,0%).
- A análise por HPLC com detecção em UV ( $\lambda$  240 - 340nm) detectou-se picos nos tempos de retenção de 11,1 min e 17,1 min em todas as frações (FV; FA; FAC; FL e FR) ressaltando que a fração FL apresentou o pico em 11, 1 min mais significativo que as demais.

- Extrato metanólico das sementes de *P. edulis* foi purificado por PTLC obtendo-se 5 frações em ordem ascendente: FV; FA; FAC; FL e FR. A partir da técnica de espectrometria de massa de ionização por “eletron spray” (ESI-MS), acoplado ao HPLC foi possível a identificação do ácido salicílico e ferúlico nos extratos purificados por PTLC. Para a quantificação destes compostos utilizou-se como padrão interno o ácido gálico obtendo-se os seguintes resultados em ácido salicílico: FV 0,04% (m/m); FA 0,07% (m/m); FAC 0,015% (m/m); FL 0,004% (m/m) e FR 0,13% (m/m). A presença de traços de ácido ferúlico foi evidenciada nas frações FA; FAC e FL.

## *Referências Bibliográficas*

---

---

---

ADAMS, G. A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 1, p. 21-31, 1985.

AGAREZ, F. V.; PIZZINI, C. M.; PEREIRA, C. **Botânica: Taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermae**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994, 243 p.

ASPINALL, G. O. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. San Diego: Academic Press, v. I, 1982, p. 19-26

ASPINALL, G. O. Structural chemistry of hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 14, p. 429-468, 1959.

BARROSO, G.M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e Sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, p. 154.

BAZUS, A.; RIGAL, L.; GASET, A. Uses of sunflower hulls-present status and outlooks. **Rev. Fr. Cosps Gras**, France, v.39, n. 11-12, p.345-350, 1992. Disponível em [webofscience.fapesp.br](http://webofscience.fapesp.br)

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlin: Springer, v. 1, 1978.

\_\_\_\_\_ Seeds germination, structure and composition. **Seeds: Physiology of development and germination**. Pleming Press, 1986, p.1-27.

BJÖRNDAL, H.; WAGSTROM, B. A. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. **Acta. Chem. Scand.**, Copenhagen, v.21, p. 1801-1804,1967.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal.Biochem.**, Orlando, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 46, n.6, p. 2123-2129, 1998.

BRESOLIN, T. M. B. **Propriedades físico-químicas de biopolímeros: xantanas/galactomananas**. Curitiba, 1998, Tese de Doutorado, UFPR.

BRETT, C.; WALDRON, K. In: **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman Ltd, 1990, p. 193.

- CARMONA, A.; LAURENTÍN, A. I.; BORGES, G. Extraction and assay of legume seeds tannins. Effect of temperature on polyphenol yield. In: **Adv. Res. Antinutr. Factor Legumes Seeds**. VAN DER POEL, A. B. F.; HUISMAN, J.; SAIRI, H. S. Pudoc Scientific Publishers, v. 2, p. 107-111, 1993.
- CARMONA, A.; SEIDL, D. S.; JAFFÉ, W. G. Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. **J. Sci. Food Agric.**, Barking, p. 291-301, 1991.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural model os primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, Oxford, v.3, n. 1, p. 1-30, 1993.
- CARVALHO, A. M. Aproveitamento da casca do maracujá para a fabricação de doces. **O Agrônômico**, Campinas, v. 20, n.7/8, p. 431, 1968.
- CARVALHO, A. R. **A cura pelas plantas e diversos meios de grande poder curativo**. São Paulo, 1970, p. 234-235.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargil, 1980.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: Recomendações silviculturais.** Potencialidades do uso da madeira. Colombo: EMBRAPA, 1994.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, Madrid, v. XLV , p. 42-45, 1997.

CHOW, Y. J; LIN, C. H. Para-hidroxybenzoic acid as the major phenolic gemination inhibitor of papaya seed. **Seed Sci. Technol.**, Zurich, v. 19, n.1, p. 167-174, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, p.235.

CORRÊA, N. C. F.; MEIRELES, M. A. A.; FRANÇA, L. F.; ARAÚJO, M. E. Extração de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos.** Campinas, v. 14 (Supl), p. 29-37, 1994.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** 2 ed. New York: Allen Press, 1988.

CUTTER, E. **Anatomia Vegetal – Parte II.** São Paulo: Roca, 1986.

DE GAULEJAC, N. S.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 47, n. 2, p. 425-431, 1999. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [capturado em 13/07/1999].

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1989, 293 p.

FELDER, N. & O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique some principles and new methods. **Amer. J. Bot.**, Columbus, v. 55, n.1, p. 123-142, 1968.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Polyoses (hemicelluloses). In: GRUYSTER, W. **Wood Chemistry, ultrastructure reactions**. Berlim, 1989, p.108-127.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLET, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 226, p.497-509, 1957.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: A molecular approach.** San Diego: Academic Press, 1994, p. 197-270.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis.** Hong Kong: Chapman and Hall, second edition, 1984, p. 37-99.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.

JOHANSEN, D.A. Lâminas permanentes, corantes e várias técnicas. **Plant microtechnique**, New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

KALLITHRAKA, S.; VIGUERA, C. G.; BRIDLE, P.; BAKKER, J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. **Phytoch. Anal.**, Chichester, v. 6, n.5, p.265-267, 1995.

KIRCHER, H. W. Gas liquid partition chromatography of sugar derivatives. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 1, p. 13-20, 1962.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes.** Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos (OEA), 1983, 174p.

- LEVIMINZI, R.; SAVIOZZI, A.; RIFFALDI, R. Organic-acids as seed-germination inhibitors. **J. Environ. Sci. Health Part A – Environ. Sci. Eng. & Toxic Hazard. Substance Control**. Monticello, v. 29, n. 10, p. 2203-2217, 1994. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [ capturado em 13/07/99]
- LI, H. H.; NISHIMURA, H.; HASEGAWA, K.; MIZUTANI, J. Allelopathy of *Sasa cernua*. **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 18, n. 10, p. 1785 -1796, 1992.
- LÖNNGREN, J.; PILLOTI, A. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates II. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 25, p. 1144-1145, 1971.
- MACIEL, A. S.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n.1, p. 1-4, 1992.
- MACCANN, M.C.; WELLS, B.; ROBERT, K. Direct visualization of crosslinks in the primary plant cell wall. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v.96, p 323-334, 1990.
- MANICA I. **Fruticultura tropical: Maracujá**, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1981, p. 3-5.
- MANKARIOS, A. T. Hydrolysis of plant polysaccharides and GLC ananlysis of their constituent neutral sugar. **Phytochemistry**, Oxon, v. 18, p. 419-422, 1971.

MAXON, E. D.; ROONEY, L. W. Evaluation of methods tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.49, p.719-729, 1972.

MOHAMEDY, A. Y.; BARRINGER, S. A.; SPLITTSTOESSER, W. E.; COSTANZA, S. The role of seed coats in seed viability. **Bot. Rev.**, New York, v.60, n. 4, p. 426-439, 1994.

MORRAL, P.; BRIGGS, D. E. Changes in cell wall polysaccharides of germinating barley grains. **Phytochemistry**, Oxford, v. 17, p.1495 -1502,1978.

PEARSON, D. A.; TAN, C. H.; GERMAN, J. B.; DAVIS, P. A.; GERSHWIN, M. E. Apple juice inhibits humn low density lipoprotein oxidation. **Life Sciences**, Oxford, v. 64, n. 21, p. 1913-1920, 1999. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [ capturado em 26/07/1999]

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr. Res.**, Tarrytownv. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [capturado em 25/05/1999].

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidafion. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 46, n. 12, p. 5132-5138, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 5 ed, 1996, 728 p.

REID, J. S. G. Cell wall storage carbohydrates in seeds – biochemistry of the seed “gums” and “ hemicelluloses”. **Adv. Bot. Res.**, London, v.11, p.125 – 155, 1985.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Plant Phenolics**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1971, 254p.

ROCHA, A. B.; SILVA, J. B. Fruto de maracujá (*Passiflora edulis* Sims): Fonte de Pectinas. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 3, p.21-23, 1981.

SANDER, P. C. **Plantas medicinais de uso relatado em leucorréias**. Porto Alegre, 1987. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. USA: John Wiley Inc., 1971.

SHAHIDI, F. Phenolic-compounds of *Brassica* oilseeds. **Acs Symp. Ser.**, Washington, v.506, p. 130-142, 1992.

SILVEIRA, M. Preparo de amostra biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUSA, W. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica: Técnicas básicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, v. 1, 1989.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditols acetate. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. San Diego: Academic Press, v. II, 1983, p. 97-183.

STRACK, D. Phenolic Metabolism. In: Dey, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**, London: Academic Press, 1997, p.387-437.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface Protection and Secondary Defense Compounds. **Plant Physiology**. New York: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1991, 565p.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses - Part I. **Adv. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v.19, p.247-302, 1964.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C.; HASHIZUME, T.; MEDINA J. C.; TURATTI, J. M. Processamento: produtos, caracterização e utilização. In: **Maracujá: Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 2ª ed, 1994, 267 p.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. F.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. **Nature**, London, v. 166, p.144-145, 1950.

WALTON, J.D. Biochemical Plant Patology. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**, London: Academic Press, 1997, p. 496.

WHISTLER, R. L.; FEATHER, M. S. Hemicellulose. Extraction from annual plants with alkaline solutions. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 5, p. 144 -145, 1953.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 2, p. 211-215, 1963.

\_\_\_\_\_.Reduction with sodium borohydrite. **Meth. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 2, p. 65-68, 1963.

YAMADA, K.; SHOJI, K.; MORI, M.; UHEYAMA, T.; MATSUO, N.; OKA, S.; NISHIYAMA, K.; SUGANO, M. Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. **In Vitro cell. & Dev. Biol. Anim.**, Columbia, v. 35, n. 3, p. 169-174, 1999. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [capturado em 25/05/1999].

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polysaccharide of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiol.**, Rockville, v.107, p.1129 -1138, 1995.

ZUKALOVA, H.; VASAK, J. Natural antioxidants in winter rape (*Brassica napus* L.) seed. **Rostl. Vyroba**, Praha, v. 44, n. 3, p. 97-101, 1998. Disponível em: <http://webofscience.fapesp.br> [capturado em 04/07/1999].